

Analyse der Hepatitis-B-Virus Variabilität - auf Ebene der Genotypen, Subgenotypen und differenzieller Genexpression

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Anja May
aus Rostock

Gutachter

Herr Prof. Dr. med. Stephan Schaefer
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Herr Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl
Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Tag der Verteidigung: 18. April 2011

Rostock, 29.07.2010

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0133-0

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Hepatitis-B-Virus (HBV).....	1
1.1.1. Die Familie der Hepadnaviren	1
1.1.2. Struktur und Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus	1
1.1.3. Der HBV-Lebenszyklus	5
1.1.4. Regulatorische Elemente	7
1.2. HBV-Genotypen.....	9
1.2.1. Weltweite geographische Verteilung der Genotypen.....	10
1.3. HBV-Varianten	11
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Materialien	14
2.1.1. Instrumente	14
2.1.2. Chemikalien, Puffer und Enzyme	15
2.1.3. Kits	17
2.1.4. Plasmide.....	17
2.1.5. Bakterienstämme.....	20
2.1.6. Zelllinien	20
2.1.7. Adenoviren	21
2.1.8. Antikörper	21
2.1.9. Oligonukleotide.....	21
2.1.10. Marker	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. DNA-Arbeitstechniken	23
2.2.2. RNA-Arbeitstechniken	29
2.2.3. Protein-Arbeitstechniken	35
2.2.4. Nachweis von Viruspartikeln	36
2.2.5. Sequenzanalyse	36

2.2.6.	Zellkulturarbeiten und Transfektion	36
2.2.7.	Adenovirale Arbeitstechniken	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1.	Charakterisierung der Genotypen A bis I	40
3.1.1.	HBsAg- und HBeAg-Nachweis extra- und intrazellulär	41
3.1.2.	Nachweis der Replikation anhand sezernierter HBV-DNA	43
3.1.3.	Nachweis von Virionen und Nukleokapsiden.....	44
3.2.	Subgenotyp C2	45
3.2.1.	Klonierung der vier Subgenotyp C2-Varianten	46
3.2.2.	Herstellung der HBxWt-, HBxPolyLysin3xTGA- und der vier Subgenotyp C2HBx-Adenoviren	50
3.2.3.	C2-Ganzgenomvarianten-Charakterisierung	53
3.2.4.	Luciferaseassay zum Nachweis der mutmaßlichen TATA-Box	56
3.2.5.	C1653-Einflüsse auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren	58
3.2.6.	<i>In vivo</i> Nachweis der TBP-Bindung mittels ChIP	65
3.2.7.	Auffinden und Kartierung verschiedener HBx-mRNAs	67
3.2.8.	Bestimmung der Genexpressionsprofile von HepG2-Zellen hervorgerufen durch HBV X-Protein-Varianten.....	72
3.3.	Studie mit Hepatitis-B-Virus Wildtyp	75
3.3.1.	Kinetik-Vorversuche zum Nachweis von HBxWt-mRNA.....	75
3.3.2.	Microarrays.....	77
3.3.3.	Rap1A-Expression in p53+HBx-transduzierten Zellen	82
3.3.4.	In Planung	83
4.	Diskussion	84
4.1.	Vergleichende Analyse der Genotypen.....	84
4.2.	Charakterisierung des Subgenotyp C2	85
4.3.	Einflüsse des HBxWt und p53 auf die Genexpression humaner Zelllinien.	95
5.	Zusammenfassung	98
6.	Literaturverzeichnis.....	100

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit werden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Système International d'Unités) verwendet. Die Abkürzungen gelten für Singular und Plural.

Abb.	Abbildung
A	Adenin
Ad	Adenovirus
ARP1	Apolipoprotein A1 regulatorisches Protein 1
AS	Aminosäure
BCP	basaler Core-Promotor
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	mRNA komplementärer Strang (engl. <i>complementary DNA</i>)
cccDNA	kovalent geschlossen zirkuläre (engl. <i>covalently closed circular</i>) DNA
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding-Protein
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
COUP-TF1	engl. <i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1</i>
Cp	Core-Promotor
CURS	engl. <i>Core Upstream Regulating Sequences</i>
dd H ₂ O	2-mal destilliertes Wasser (engl. <i>double distilled H₂O</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
E bzw. Enh	Enhancer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced</i> grünfluoreszierendes Protein
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbant sandwich assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HBcAg	Hepatitis B Core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B Oberflächen (engl. <i>surface</i>) Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis B Virus X Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HNF	engl. <i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>

ICTV	engl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
kB	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
LB	<i>Luria Broth</i>
LHBs	großes Hepatitis B Oberflächenprotein (engl. <i>large HB surface protein</i>)
MEM-NEAA	<i>Minimal Essential Medium-Non-Essential Amino Acid</i>
MHBs	mittleres Hepatitis B Oberflächenprotein (engl. <i>middle HB surface protein</i>)
MKS	Multiple Klonierungsstelle
MOI	Infektionsmultiplizität (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
ncbi	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
n	Anzahl unabhängiger Experimente
NK	Negativkontrolle
NRE	Negativ Regulierendes Element
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pgRNA	prägenomische RNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	Relative Lichteinheiten (engl. <i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription bzw. Reverse Transkriptase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
S / CO-Ratio	Quotient von Probenwert und Grenzwert (engl. <i>sample / cut-off</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	kleines Hepatitis B Oberflächenprotein (engl. <i>small HB surface protein</i>)
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
StA	Standardabweichung
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-bindendes Protein
TE	Tris-EDTA-Puffer
tRNA	Transfer-RNA (engl. <i>transfer RNA</i>)
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel
Ø	Ohne Insert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Hepatitis-B-Virus (HBV).	2
Abbildung 1-2: Genomorganisation des HBV.	3
Abbildung 1-3: Intrazellulärer HBV-Lebenszyklus.	6
Abbildung 1-4: Core-Promotor / Enhancer II mit Bindungsorten der Transkriptionsfaktoren.	8
Abbildung 1-5: Geographische Verteilung der HBV-Genotypen und Subgenotypen.	10
Abbildung 2-1: Überblick über die RLM-RACE Methode.	34
Abbildung 2-2: Primerpositionen der 5'-RACE.	34
Abbildung 3-1: Bestimmung von extrazellulärem HBsAg und HBeAg.	41
Abbildung 3-2: Bestimmung von intrazellulärem HBsAg und HBeAg.	42
Abbildung 3-3: Analyse der differentiellen Replikation der Genotypen.	43
Abbildung 3-4: Nachweis von Virionen.	44
Abbildung 3-5: Klonierungsstrategie des C2TAG-Ganzgenoms in pBluescript. ...	47
Abbildung 3-6: Klonierungsstrategie der C2CTA- und C2CAG-Ganzgenome in pBluescript.	48
Abbildung 3-7: Drei Klonierungsstrategien zur Herstellung von pAdTrack-CMV- HBx-Vektoren.	51
Abbildung 3-8: Darstellung des Ablaufs der homologen Rekombination hin zu den fertigen Adenoviren.	53
Abbildung 3-9: Quantifizierung von HBsAg der vier C2-Ganzgenome in HuH7- und HepG2-Zellen.	54
Abbildung 3-10: Vergleichende Analyse der DNA-Konzentrationen und RNA- Expressionen der vier C2-Ganzgenome in HuH7- und HepG2-Zellen.	55
Abbildung 3-11: Strategien zur Klonierung partieller HBxCTA- und HBxTTA- Sequenzen.	56
Abbildung 3-12: Luciferase-Reporterexperimente zur Analyse des Einflusses des C1653T-Austausches auf einen putativen Promotorbereich in HepG2-Zellen.	57
Abbildung 3-13: Nachweis unterschiedlicher transkriptioneller Regulation von CTA und TTA durch die drei Transkriptionsfaktoren.	58

Abbildung 3-14: HBsAg-Analyse der kotransfizierten C2-Ganzgenom-Varianten CAG, CTA, TAG und TTA mit den Transkriptionsfaktoren in HepG2- und HuH7-Zellen.	60
Abbildung 3-15: Phänotypische Analyse von Kotransfektionen der vier C2-Varianten CAG, CTA, TAG und TTA mit den Transkriptionsfaktoren E4BP4, HLF und FTF in HuH7-Zellen.	63
Abbildung 3-16: Phänotypische Analyse von Kotransfektionen der vier C2 Varianten CAG, CTA, TAG und TTA mit den Transkriptionsfaktoren E4BP4, HLF und FTF in HepG2-Zellen.	64
Abbildung 3-17: Vergleich Input- zu ChIP-DNA der beiden PCRs.	66
Abbildung 3-18: PCR-Ergebnis nach RACE der adenoviralen HBxC2-Konstrukte.	68
Abbildung 3-19: PCR-Ergebnis nach RACE der transfizierten linearisierten C2-Ganzgenom-Proben.	69
Abbildung 3-20: Kinetik der HBx-mRNA-Expression in mit adenoviralen HBxSchröderWt transduzierten HepG2- und WI38-Zellen.	76
Abbildung 3-21: Streudiagramm-Analyse des Verhältnisses der Genexpression von HepG2- bzw. WI38-Zellen (0) zu denselben Zellen mit p53+HBx transduziert.	78
Abbildung 3-22: Streudiagramm-Analyse der Genexpression von p53+HBx transduzierten HepG2- und WI38-Zellen zu ausschließlich mit p53 transduzierten Zellen.	79
Abbildung 3-23: Hauptkomponentenanalyse der zwölf Microarrays.	82
Abbildung 3-24: Ergebnisse der RT-PCR zur Bestätigung der Rap1A-Hochregulierung auf RNA-Ebene.	83
Abbildung 4-1: Kartierung der HBx-mRNA-Starts <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Genomlänge und Unterschiede der einzelnen HBV-Genotypen.	9
Tabelle 2-1: Infektionsmultiplizität der verschiedenen Zelllinien.	39
Tabelle 3-1: In der Arbeit verwendete Varianten des Subgenotypes C2.	46
Tabelle 3-2: Hergestellte C2-Plasmide mit den jeweils vorhandenen Basenaustauschen.	50
Tabelle 3-3: Einfluss der Varianten C1653T und A1762T/G1764A auf die Bindung von TBP an die basale Core-Promotor (BCP)-Region.	65
Tabelle 3-4: Sequenziererergebnisse nach RACE auf Basis der vier Adenoviren- Konstrukte der HBxC2-Varianten.	68
Tabelle 3-5: Sequenziererergebnis der nach RACE erhaltenen DNA-Amplifikate der C2-Ganzgenom-Proben.	69
Tabelle 3-6: Vergleich der Signalintensitäten der Banden aus dem Adenoviren- Versuch.	70
Tabelle 3-7: Vergleich der Signalintensitäten der Banden aus dem Ganzgenom- Versuch.	70
Tabelle 3-8: Auflistung der ermittelten mRNA-Starts der Leberbiopsie-Proben....	72
Tabelle 3-9: Liste der übereinstimmend induzierten Gene des Genexpressionsprofils von HepG2-Zellen aller C2HBx- und HBxPolyLysin- cDNA-Microarrays.	73
Tabelle 3-10: Genexpressionsprofil in HBx-transduzierten HepG2-Zellen verglichen mit HepG2 ermittelt durch cDNA-Microarrays.	74
Tabelle 3-11: Microarray-Analyse in tabellarischer Form.	80
Tabelle 3-12: Erhalt von zwei differenziell hochregulierten Genen und Kategorisierung durch hochregulierenden Faktor.	81

1. Einleitung

1.1. Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

1.1.1. Die Familie der Hepadnaviren

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört zur Familie der *Hepadnaviridae* (Taxonomie entsprechend ICTV). Der Name *Hepadnaviridae* leitet sich ab vom griechischen „Hepar“, was auf den Lebertropismus hinweist und vom englischen „dna“ für Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die Familie der *Hepadnaviridae* unterteilt sich in die Genera *Orthohepadnaviren*, die Säugetiere infizieren, und *Avihepadnaviren*, die Vögel als Wirte nutzen, z. B. das Enten (duck) Hepatitis Virus (DHBV). Vertreter der *Orthohepadnaviren* sind z. B. das der Hepatitisforschung als Modellsystem dienende Walddarmmeltier (*woodchuck*) Hepatitis Virus (WHV) sowie das Erdhörnchen (ground squirrel) Hepatitis Virus (GSHV). *Hepadnaviridae* zeichnen sich durch einen strikten Lebertropismus und ein enges Wirtsspektrum aus. Sie können sowohl akute als auch chronische Hepatitis verursachen, besitzen aber keine direkte Zytopathogenität [1]. Die Bezeichnung *Pararetroviren* erhielten sie, weil sie ihre DNA mittels Reverser Transkriptase über ein RNA-Prägenom replizieren [2] und somit eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Retroviren aufweisen [3].

1.1.2. Struktur und Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus

Die infektiösen, sphärischen Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von 42 - 47 nm [4] und sind von einer Lipidhülle umgeben, in die die 3 viralen Oberflächenproteine (kleines (SHBs), mittleres (MHBs) und großes (LHBs) Oberflächenprotein) eingelagert sind (Abbildung 1-1). Innerhalb der Virionhülle befindet sich das ikosaedrische Nukleokapsid, welches aus 180 oder 240 Core-Proteinen besteht [5-7]. Es umschließt das offen zirkuläre, partiell doppelsträngige, mit der viralen Polymerase assoziierte DNA-Genom [8], welches je nach Genotyp 3182 - 3221 bp groß ist. Somit gehört das Hepatitis-B-Virus-Genom mit zu den kleinsten bei Viren gefundenen Genomen. Neben den Hepatitis B-Virionen können im Blut HBV-infizierter Menschen auch subvirale Partikel nachgewiesen werden. Diese sind nicht infektiös, da sie ausschließlich aus Hüllproteinen bestehen und keine

Nukleinsäuren enthalten. Von infizierten Zellen werden sie in zwei verschiedenen Formen, als sphärische oder filamentöse HBsAg-Partikel, sezerniert.

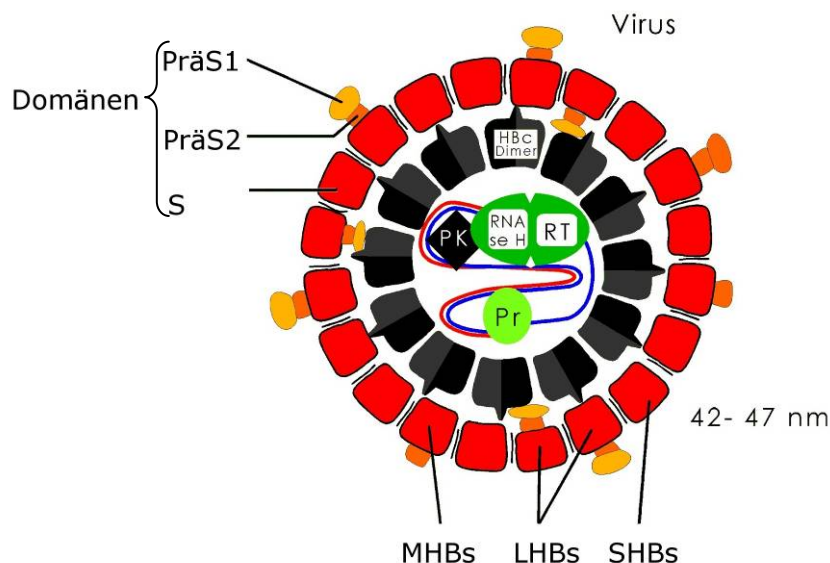


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Hepatitis-B-Virus (HBV). SHBs, MHBs, LHBs: kleines, mittleres und großes HBV-Hüllprotein; S, PräS1- und PräS2-Domäne der HBV-Hüllproteine; HBc: Hepatitis B Core-Protein; RT, Pr: Reverse Transkriptase und Primase-Anteile der HBV-Polymerase; PK: Proteinkinase C. (Modifiziert nach [9])

Die zirkuläre Genomstruktur entsteht durch eine Überlappung der kohäsiven 5'-Enden des Minus- und Plus-DNA-Stranges in einem Bereich zwischen den *direct repeat* 1 und 2-Sequenzen (DR1 und DR2). Der Minusstrang, an dessen 5'-Ende die virale DNA-Polymerase kovalent gebunden ist [10], kodiert für virale Proteine und wird im Replikationszyklus transkribiert. Der komplementäre Plusstrang hat ein definiertes 5'-Ende und ein variables 3'-Ende. Er umfasst 40 bis 85 % des Genoms und besitzt somit eine variable Länge von 1.100 - 2.600 Nukleotiden [11, 12]. Auf ihm sind keine viralen Genprodukte kodiert, weshalb er auch nicht transkribiert wird. Das HBV-Genom beinhaltet vier offene teilweise überlappende Leserahmen (ORF), welche alle in derselben Richtung abgelesen werden (Abbildung 1-2). Die Transkription der vier mRNA-Transkripte (3,5 kB, 2,4 kB, 2,1 kB und 0,7 kB), welche alle an einem einzigen gemeinsamen Polyadenylierungssignal enden, wird von den S1-, S2-, C- und HBx-Promotoren sowie den *Enhancern* Enh I und Enh II reguliert. Bis auf den S1-Promotor fehlt den anderen Promotoren die klassische TATA-Box als Startpunkt der Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes [13]. Alle Promotoren außer dem HBx-

Promotor enthalten eine oder mehrere SP1-Bindungsstellen. Die Expressionsregulation erfolgt beim HBx-Promotor über das LSR-Element [14]. Der PräC/Core-ORF kodiert für das PräCore- und das Core-Protein, der PräS/S-ORF für die drei Oberflächenproteine, der P-ORF für die virale Polymerase und der X-ORF für das HBx-Protein.

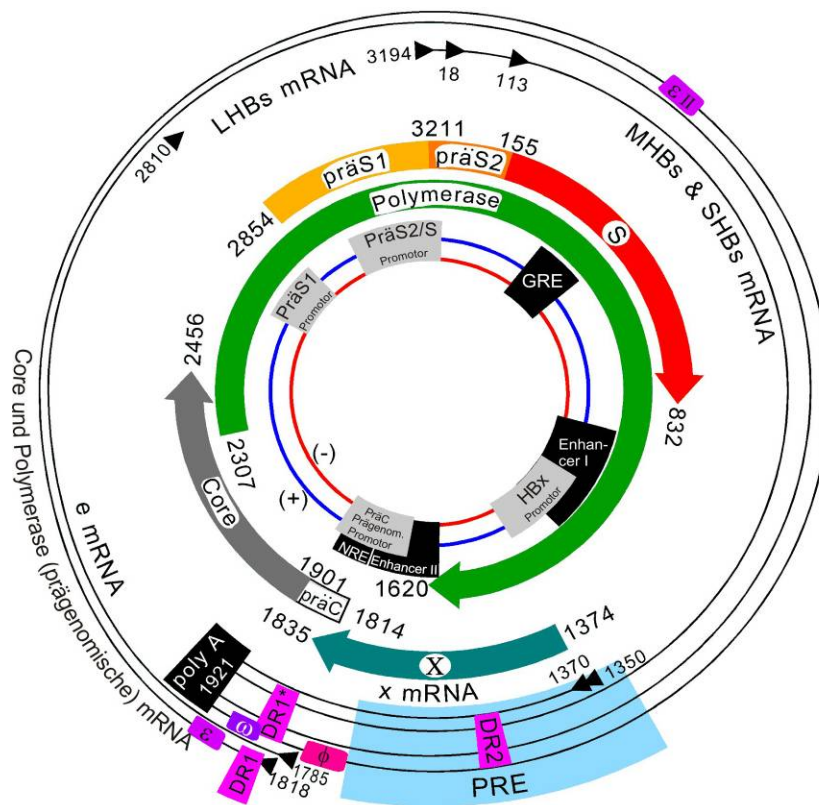


Abbildung 1-2: Genomorganisation des HBV. Im Zentrum der Abbildung ist die cccDNA mit den Regulatorsequenzen des HB-Virus abgebildet. In der Mitte der Abbildung sind die offenen Leserahmen des HBV-Genoms dargestellt. Gelb/Orange/Rot: Leserahmen für die Oberflächenproteine SHBs, MHBs, LHBs. Grün: Leserahmen für die Polymerase. Blau: Leserahmen für das HBx-Protein. Grau: Leserahmen für das Core-Protein. Außen sind die transkribierten HBV-mRNA Produkte gezeigt. PRE: Post-transkriptionales-regulatorisches Element, ϵ : Verpackungssignal. Poly A: Polyadenylierungssignal. DR1 Direct repeat 1 und DR2 Direct Repeat 2. NRE: negativ regulierendes Element. GRE: Glucocorticoid Responsive Element. Schwarze Dreiecke stellen die unterschiedlichen 5'-Enden der HBV-mRNA dar. (Modifiziert nach [15])

Der C-ORF kodiert für das Core-Protein und das Hepatitis B e Antigen (HBeAg). Er hat zwei im Leserahmen befindliche Startkodon, wobei die Region zwischen dem ersten (PräC-ATG) und zweiten (C-ATG) Startkodon als PräC-Region

bezeichnet wird. Ausgehend vom C-ATG wird von der prägenomischen RNA (pgRNA) im Zytoplasma das Core-Protein synthetisiert. Dimere des Core-Proteins werden zum Kapsid assembliert. Von der PräC-mRNA wird, vom PräC-ATG ausgehend, das PräCore-Polypeptid synthetisiert, welches den Vorläufer des HBeAg darstellt. Dieses wird von der Zelle sezerniert und zirkuliert im Blut. Es wird weder für die Morphogenese noch für die Infektion benötigt, jedoch scheint es je nach Aufenthaltsort eine duale Funktion zu übernehmen. Ziel einer inflammatorischen Immunantwort könnte zytosolisches HBeAg sein. HBeAg im Serum hingegen scheint immunregulatorische Funktionen auszuüben, was zum Auslösen einer T-Zelltoleranz und damit verbunden, einer Hemmung der HBcAg-spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort führt [16, 17].

Die drei durch den zweiten Leserahmen kodierte Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs besitzen einen identischen Carboxyterminus, unterscheiden sich jedoch im Aminoterminal. Sie werden *in frame* an drei unterschiedlichen ATGs initiiert, welche den S-ORF in die Domänen PräS1, PräS2 und S untergliedern. So besteht das SHBs aus der S-Region, das MHBs zusätzlich noch aus der PräS2-Domäne und das LHBs verlängert das MHBs um die PräS1-Domäne (Abbildung 1-1). Die Topologie des LHBs ist variabel. So kann die PräS1-Domäne sowohl nach Innen gerichtet vorliegen [18], wo sie unter Umständen über das zelluläre HSC 70 Protein (heat shock cognate 70) mit dem Kapsid verbunden ist [19], als auch exponiert auf der viralen Hülle [7]. Die Gesamtheit der Oberflächenproteine bildet das so genannte HBs-Antigen (HBsAg).

Die Polymerase, für welche der dritte ORF (dieser überlappt mit allen anderen ORF des HBV-Genoms) kodiert, wird beginnend von einem internen Startkodon auf der pgRNA translatiert. Sie vermittelt die Verpackung des Prägenoms in das Nukleokapsid und synthetisiert darin das HBV-Genom.

Der vierte und kleinste ORF kodiert für das HBx-Protein [20], welches sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern von infizierten Hepatozyten zu finden ist und das mutmaßlich einzige nichtstrukturelle HBV-Gen darstellt. Ihm werden vielfältige, regulatorische Funktionen zugeschrieben, wobei seine tatsächliche Rolle im HBV-Replikationszyklus nach wie vor ungeklärt ist. So wird es u. a. mit der Regulation von Genexpression, Zellantwort, Apoptose, Genotoxizität, Proteinabbau und Signalkaskaden (Ras/MEK/MAPK, JNK/JAK/STAT und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Signalwege [21, 22]) in Verbindung gebracht [21-23]. Für die Virus-

produktion *in vitro* von transfizierten Zellen wird es nicht benötigt [24]. *In vivo* hingegen findet ohne das *Woodchuck* Hepatitis X-Protein keine Infektion beim Waldmurmeltier statt [25, 26]. HBx wirkt als Transaktivator auf eine Reihe viraler und zellulärer Promotoren, u. a. indem es mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie oder Transkriptionsfaktoren wie dem TATA-bindenden Protein TBP interagiert oder Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP1 beeinflusst [22, 27]. Es selbst hat keine DNA-bindenden Eigenschaften, sondern wirkt vorrangig via Protein-Protein-Wechselwirkungen. Auch eine Rolle bei der Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms wird diskutiert [28, 29]. Da der tumorigene Effekt des HBx allein schwach ist, benötigt und nutzt es zusätzliche karzinogene Faktoren [30, 31].

1.1.3. Der HBV-Lebenszyklus

Der Infektions- und Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus beginnt, indem sich das HBV im Dissé'schen Raum an Heparan-Sulfat-Proteoglykane bindet [32, 33]. Daran schließt sich die Bindung an einen bislang unbekannten Rezeptor und die Aufnahme per Endozytose an (Abbildung 1-3). Das Nukleokapsid wird auf einem bislang noch unbekannten Weg freigesetzt [34]. Mit Hilfe von Mikrotubuli und zellulären Transportproteinen wird es zum Zellkern transportiert [35] wo es an den Kernporen im nukleären Basket desintegriert. Das so freiwerdende virale Genom wird in das Nukleoplasma entlassen [36]. Im Nukleus wird aus der partiell doppelsträngigen Virus-DNA eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (*circular covalently closed* DNA = cccDNA) gebildet. Von der cccDNA ausgehend werden das RNA-Prägenom und die mRNAs für die viralen Proteine synthetisiert. Die Transkription des DNA-Minusstranges erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase. Auf diese Art und Weise entsteht die prägenomische mRNA (pg-mRNA), welche ins Zytoplasma exportiert wird, wo die Translation der Polymerase und des Core-Proteins stattfindet.

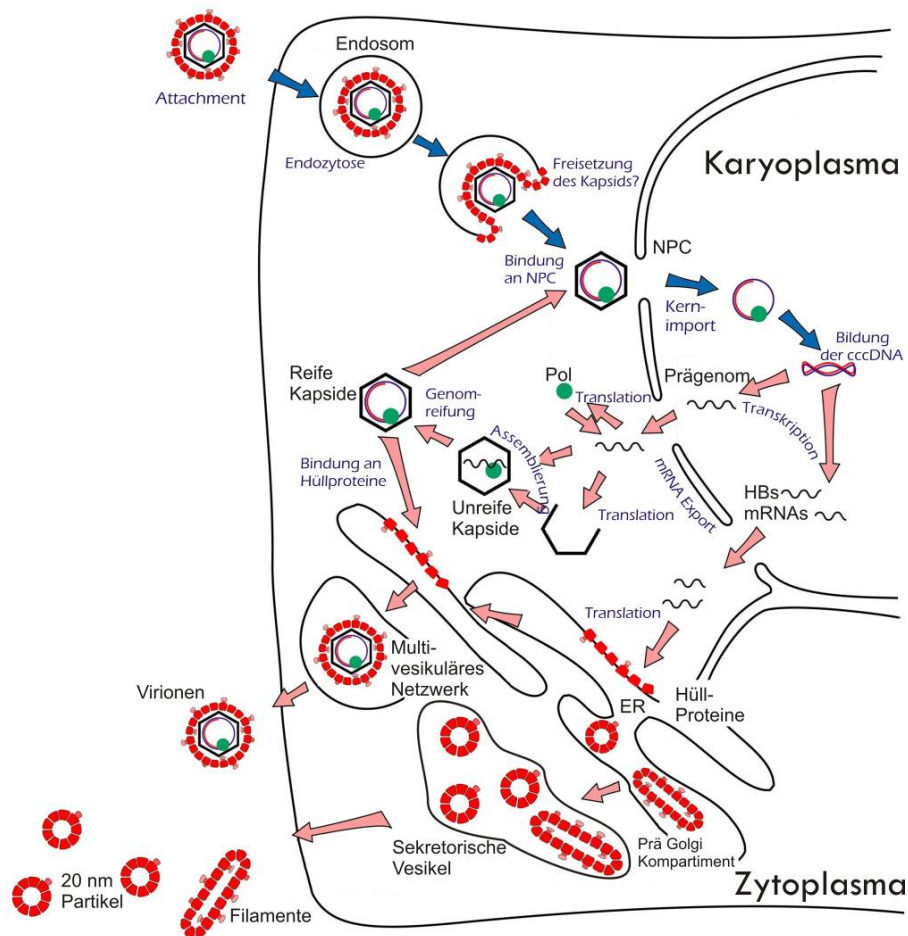


Abbildung 1-3: Intrazellulärer HBV-Lebenszyklus. NPC bezeichnet den nuclear pore complex, Pol: Polymerase, ER: Endoplasmatisches Retikulum. Die mRNAs sind geschlängelt dargestellt. Die Expression der subviralen HBsAg, des HBeAg und des HBx-Proteins wurden zur Vereinfachung der Abbildung weggelassen. (Modifiziert nach [9])

Wenn genügend Core-Protein synthetisiert ist, assemblieren diese zu Core-Partikeln [37]. Die Core-Partikel schließen sowohl die pg-mRNA, die virale Polymerase, das Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) als auch eine zelluläre Proteinkinase ein [38-41]. Innerhalb der Core-Partikel (Nukleokapside) findet die reverse Transkription der pgRNA in Minusstrang-DNA und die Plusstrangsynthese statt [2]. Wenn diese abgeschlossen ist, können die Core-Partikel zwei verschiedene Wege einschlagen. Zum Einen kann ein nukleärer Reimport stattfinden. Dies geschieht besonders häufig zu Beginn einer HBV-Infektion, wenn noch nicht ausreichend Hüllprotein produziert wurde. Nach dem Transport durch die Kernpore deassemblieren die Kapside und setzen die virale DNA im Zellkern wieder frei [42-44]. Dadurch erhöht sich die cccDNA-Konzentration im Zellkern [45, 46]. Diese intrazelluläre Reinfektion etabliert eine persistente Infektion der

Zelle ohne stabile Integration der viralen DNA. Andererseits, wenn genügend mRNAs produziert worden sind, können die gereiften Nukleokapside [47, 48] mit den in der ER-Membran eingelagerten Oberflächenproteinen interagieren und bilden dann wahrscheinlich durch Knospung neue reife Viruspartikel, die über die *multivesicular bodies* von den Hepatocyten ins Blut exozytiert werden [49].

1.1.4. Regulatorische Elemente

Die virale Genexpression wird durch vier Promotoren (S1, S2, C und HBx) kontrolliert, die ihrerseits durch die *Enhancer* Enh I und Enh II und diverse Transkriptionsfaktoren reguliert werden [13].

Der S1-Promotor kontrolliert die Transkription der 2,4 kB mRNA, welche für das Oberflächenprotein LHBs kodiert. Der S2-Promotor kontrolliert die Transkription der 2,1 kB RNA, welche durch Benutzen zweier verschiedener Startkodons die Oberflächenproteine MHBs und SHBs translatiert.

Der HBx-Promotor (nt 1230-1376) reguliert die Transkription der HBx-mRNA. Er enthält u. a. Bindungsorte für Transkriptionsfaktoren [13]. Aber auch das Tumorsuppressorprotein p53 kann an diesen Promotor binden und damit dessen Funktion unterdrücken [50]. Umgekehrt kann die Bindung von HBx an p53 auch dazu führen, dass die p53-Tumorsuppressor-Funktion inhibiert wird [51-53]. Dies stellt ein bedeutendes Ereignis in der viralen Transformation dar, da das sich ausbreitende Virus in der Wirtszelle somit nicht mehr gestoppt werden kann.

Für die Regulation der Transkription der beiden 3,5 kB langen RNAs, PräC-mRNA und pgRNA, zeichnet der Core-Promotor (Cp) verantwortlich. Damit spielt er auf der einen Seite eine zentrale Rolle in der Steuerung der Virusreplikation und Translation von Core-Protein und Polymerase von der pgRNA, auf der anderen Seite regelt er die Synthese des HBeAg von der PräC-mRNA. Der Cp setzt sich aus zwei Abschnitten zusammen (Abbildung 1-4), dem basalen Core-Promotor (BCP, nt 1742-1849), welcher für die Initiation beider mRNAs ausreichend ist, und den Core stromaufwärts regulierenden Sequenzen (CURS, nt 1634-1742), welche die Aktivität beider mRNAs bestimmen [54]. Die CURS werden in zwei Domänen unterteilt, die CURS-A (nt 1636-1703) und die CURS-B (nt 1702-1713). Die CURS-A wiederum besteht aus den Sequenzmotiven α (nt 1644-1666), γ (nt 1671-1686) und δ (nt 1687-1703), welche einen positiven regulatorischen Effekt auf den BCP haben. Einen negativen regulatorischen Effekt auf den BCP hat die aus der

β -Box (nt 1702-1713) bestehende CURS-B. Die Aktivität des Core-Promotors kann Zelltyp abhängig durch ein sogenanntes negativ regulierendes Element (NRE, nt 1611-1634) unterdrückt werden. Als ein weiteres regulatorisches Element wurde das post-transkriptionale-regulatorische Element (PRE) identifiziert, welches eine Rolle in der HBV-Genexpression spielt [55], indem es in *cis* die HBx-RNA-Menge reguliert und den Export ungespleißter Transkripte fördert.

Die Aktivität der vier Promotoren wird überwiegend durch die zwei Enhancer reguliert. Der Enhancer I (Enh I) befindet sich an nt-Position 1080-1234, welcher somit mit dem HBx-Promotor überlappt [56, 57]. Der Enhancer II (Enh II) ist an nt-Position 1636-1741 lokalisiert [58]. Der Enh I, welcher durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren (z. B. NF1, HNF3, HNF4 und COUP-TF1) reguliert wird, stimuliert den Cp, den HBx-Promotor und in geringem Maß auch die Transkription der beiden Oberflächen-mRNAs. Der Enh II hat einen stimulierenden Effekt auf alle vier Promotoren und scheint für den strikten Lebertropismus verantwortlich zu sein [57]. Auch dieser Enhancer weist Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf, so z. B. für PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), SP1 (*SV40 promoter protein 1*) [59, 60], FTF (*fetoprotein transcription factor*) [61, 62], E4BP4 [63], den Hepatozyten-Leukämiefaktor (HLF) und das TATA-box binding protein (TBP) [64].

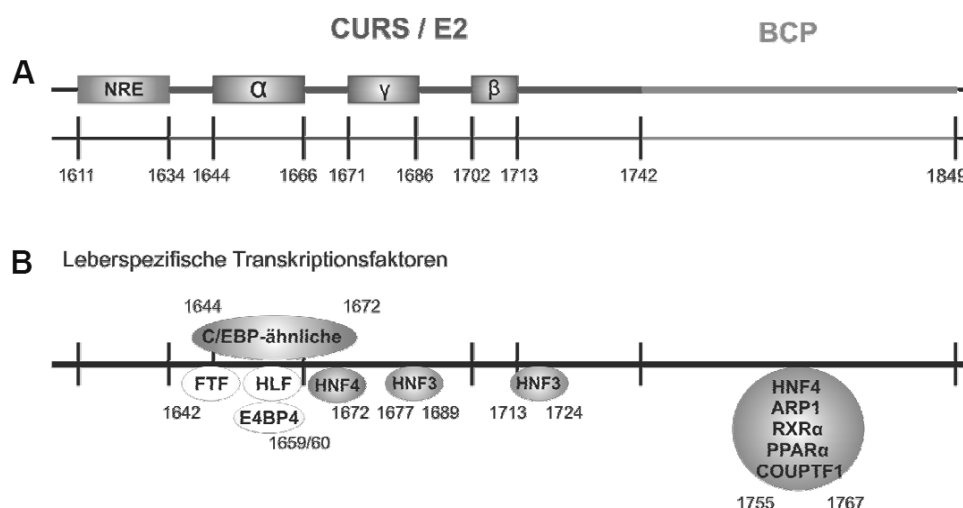


Abbildung 1-4: Core-Promotor / Enhancer II mit Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren.

A: schematische Darstellung des Cp/Enh II mit dem basalen Core-Promotor (BCP), der core upstream regulatory sequences (CURS)-Boxen α , β , γ und dem negativ regulierenden Element (NRE). B: Bindungsstellen der leberspezifischen Transkriptionsfaktoren. Für Abkürzungen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis. (Modifiziert nach [65, 66])

1.2. HBV-Genotypen

Vor zwei Jahrzehnten wurde eine Einteilung von HBV anhand von Nukleotidsequenz-Unterschieden vorgeschlagen [67]. Mittlerweile sind zehn Genotypen bekannt, welche von A bis J alphabetisch nummeriert sind. Jedoch ist diese Einteilung im Detail sehr umstritten. Für die Genotypen A bis H besteht in der Wissenschaftlergemeinschaft Konsenz darüber, dass sie als Genotypen anerkannt werden. Die Entdeckung und Klassifikation der Genotypen I und J wird noch diskutiert [68, 69].

In den ersten Publikationen zum Thema wurde konstatiert, dass sich die Genotypen in mindestens 8 % ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden [67]. Heute wird ein Unterschied von mehr als 7,5 % vorgeschlagen [69]. Die Genotypen A bis H erfüllen diese Vorgaben. Die Länge der Genome der verschiedenen HBV-Genotypen variiert (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Genomlänge und Unterschiede der einzelnen HBV-Genotypen.

Genotyp	Genomlänge in bp	ORF-Unterschiede	Referenz
A	3221	Insertion von AS 153 und 154 im HBc-Protein	[67]
B	3215		[67]
C	3215		[67]
D	3182	Deletion der AS 1-11 in PräS1-Region	[67]
E	3212	Deletion der AS 11 in der PräS1-Region	[70]
F	3215		[71]
G	3248	Insertion von 12 AS im HBc-Protein; Deletion der AS 11 in der PräS1-Region	[72]
H	3215		[73]
I	3215		[74, 75]
J	3182	Deletion von 11 AS in der PräS1-Region	[76]

Vor einem Jahrzehnt wurde der Vorschlag unterbreitet die Genotypen in Subgenotypen zu untergliedern [77]. Bislang wurden für die Genotypen A, B, C, D, F und I Subgenotypen beschrieben (Übersichtsarbeit von [69]). Subgenotypen unterscheiden sich in mindestens 4 % ihrer Nukleotidsequenz. Beim Auftreten von Clustern mit weniger als 4 % Nukleotidsequenz-Unterschied spricht man heutzutage von Clades [78].

1.2.1. Weltweite geographische Verteilung der Genotypen

HBV-Genotypen und -Subgenotypen zeigen eine deutliche geographische Verteilung (Abbildung 1-5). Nur ein einziger vorherrschender Genotyp kann jeweils in Ost- und Westafrika (Genotyp A bzw. D) kartiert werden [69], wobei der Prozentsatz des Auftretens der anderen Genotypen bei weniger als 5 % liegt. Auf der anderen Seite wird über eine Vielzahl von Genotypen in den Ländern berichtet, in denen ein hohes Maß an Immigration stattfindet. In Europa und Nordamerika sind alle Genotypen zu finden, in Australien die Genotypen A, B, C und E mit gleicher Prävalenz. Unter allen in Europa vorkommenden Genotypen ist im Norden vorrangig der Genotyp A zu finden, wohingegen in Südeuropa Genotyp D vorherrscht [79]. Die Genotypen B und C sind hauptsächlich in Süd- und Südostasien, sowie der Pazifischen Region zu finden, hingegen die Genotypen A und F in Südamerika bzw. E und A in Zentralafrika. Genotyp G tritt in Europa und den USA auf, wobei vereinzelte Infektionen auch aus Asien [80, 81] und Brasilien [82] berichtet werden. Genotyp H ist begrenzt auf Zentralamerika [83], wohingegen Genotyp I in Vietnam und Laos [75] beschrieben wurde und Genotyp J möglicherweise in Borneo zu finden ist [76].



Abbildung 1-5: Geographische Verteilung der HBV-Genotypen und Subgenotypen. (adaptiert nach [84])

1.3. HBV-Varianten

Die HBV-Polymerase mit ihrer nicht vorhandenen *proof-reading*-Funktion stellt den Hauptgrund für die Entstehung von Mutationen dar. Durch fehlerhaften Nukleotideinbau bei der reversen Transkription entstehen in hohem Maße Punktmutationen im gesamten Genom. Aber ebenso erhöhen Fehler der zellulären RNA-Polymerase bei der Synthese der pgRNA die Mutationsrate. Da das HBV so ein kleines und kompaktes DNA-Genom besitzt, welches durch das Auftreten von überlappenden Leserahmen gekennzeichnet ist, werden jedoch viele Basenaustausche nicht toleriert und führen zu Polymerase- und replikationsdefekten Viren [85].

Durch die individuelle Anpassung des HBV innerhalb des Wirtes und durch Faktoren wie immunselektivem Druck oder antiviraler Therapie, entwickeln sich HBV-Populationen in einem Patienten, die aus einer Mischung verschiedenster Varianten (Quasispezies) bestehen. So sind z. B. verschiedene Stadien einer chronischen Hepatitis durch das Auftreten bestimmter Mutationsmuster charakterisiert [86]. Im Verlauf einer Infektion können so Varianten selektiert und angereichert werden, die der Situation im Wirt besser angepasst sind, sodass sie z. B. dem Wildtyp gegenüber Vorteile haben.

Chronisch infizierte Patienten, die auch nach Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe HBV-DNA positiv blieben, weisen meist eine Mutation bei nt 1896 in der PräCore-Region auf, wodurch ein Stoppkodon entsteht und somit kein HBeAg mehr gebildet werden kann [87, 88].

Doppelmutationen im basalen Core-Promotor (BCP) wurden z. B. bei Patienten mit chronischer oder fulminanter Hepatitis B nachgewiesen. Diese Mutationen entstehen bei Nukleotid 1762, wo ein Basenaustausch von A>T (A1762T) stattfindet, in Kombination mit einem G>A-Austausch bei nt 1764 (G1764A). Auch diese Mutationen haben einen Einfluss auf die HBeAg-Konzentration, denn HBeAg wird aufgrund verminderter Bindung einiger Transkriptionsfaktoren weniger stark produziert. Zusätzlich wird die virale Replikation *in vitro* erhöht [89]. *In vivo* weisen HBeAg-negative Mutanten oft eine reduzierte Viruskonzentration auf. Je nach klinischer Situation führt dies zu mehr oder weniger starken Entzündungsreaktionen.

Eine Metaanalyse zeigte, dass eine Reihe von Punktmutationen im Core-Promotorbereich mit einem erhöhten HCC-Risiko assoziiert sind [90]. Neben der

Doppelmutation nt 1762/1764 erhöht eine Mutation von C zu T bei nt 1653 (C1653T) in der Box α wahrscheinlich ebenfalls das Risiko eines Patienten mit einer HBV Genotyp C-Infektion, an einem Hepatozellulären Karzinom zu erkranken [91-93]. Die T1653-Mutation wandelt die Box α -Bindungsstelle für C/EBP und verwandte Faktoren [54, 63] in eine perfekte palindromische Sequenz 1648-TCTTATATAAGA, welche möglicherweise die Bindungsaffinität und die Enhancer II/Core-Promotor-Aktivität steigert. Folglich kann die T1653-Mutation die HBeAg-Produktion und die virale Replikation durch BCP-Aktivität beeinflussen. Welchen Einfluss diese Mutation auf die Funktion des HBx-Proteins hat, ist bislang noch nicht geklärt.

In fast allen HCC-Patienten ist chromosomal integrierte virale DNA zu finden [94-96], was zu der Annahme führt, dass diese DNA eine kritische Rolle in der Transformation und in der Aufrechterhaltung des transformierten Stadiums spielt. Jedoch weisen auch chronisch infizierte humane Leberzellen bereits integrierte HBV-DNA auf, welche wahrscheinlich dort mit der primären Infektion beginnt zu akkumulieren [97]. Auch die HBx-Sequenz kann so aufgrund eines kryptischen Polyadenylierungssignals (PolyLysin) in der 3'-Region des HBx-ORF in verkürzter integrierter Form vorliegen [98, 99]. Es gibt Hinweise darauf, dass die vom verkürzten HBx translatierte verkürzte RNA [100] denselben Einfluss auf das Zellwachstum wie das Vollängen-Protein [101, 102] oder ein HBx/Zell-Hybridprotein hat [103].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Weltweit sind 350 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert. Damit stellt das Virus eines der meist vorkommenden humanen Pathogene dar und verursacht dadurch signifikante Probleme für die Gesundheit der Weltbevölkerung. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die HBV-Genotypen und -Subgenotypen einen Einfluss auf akute und chronische Infektionen besitzen. Dies führt zu einer zunehmenden klinischen Bedeutung der Genotypen, da signifikante Unterschiede im Ansprechen auf Therapie und Schwere der Erkrankung vielfach beschrieben sind. Jedoch sind die molekularen Mechanismen der klinisch beobachteten Unterschiede zwischen den HBV-Genotypen wenig bekannt.

Ein Ziel dieser Arbeit wird es sein, die zugrunde liegenden molekularen Unterschiede erstmals parallel für die neun Genotypen A – I zu untersuchen.

Im zweiten Komplex der vorliegenden Arbeit soll auf Basis des Genoms eines HCC-Patienten, welcher mit dem Subgenotyp C2 infiziert ist, untersucht werden, welchen Einfluss durch Punktmutationen entstehende Varianten auf die Replikation des Virus und die Genexpression der infizierten Zelle besitzen.

Im dritten Komplex wird der Einfluss der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 mit dem Hepatitis-B-Virus X-Protein auf die zelluläre Genexpression analysiert.

Diese Untersuchungen, beginnend auf der Genotypen-, über die Subgenotypen- hin zur Proteinebene, sollen die Erkenntnisse über das Hepatitis-B-Virus erweitern, um so vielleicht in Zukunft eine individuell angepasste Therapie dem Patienten zukommen zu lassen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Instrumente

Instrumente	Hersteller
AxSYM System	Abbott, Wiesbaden
Binokularmikroskop	Zeiss, Jena
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator (Zellkultur)	Labotect, Göttingen
CO ₂ -Inkubator Heraeus (Labor)	Kendro, Hanau
Curix 60 Filmentwicklungsmaschine	AGFA Health Care (Berlin)
DNA Engine Opticon 2 Realtime-PCR Detection System	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät EasyJecT	EquiBio Ltd., Maidstone, Großbritannien
Gefrierschrank Herafreeze	Kendro, Hanau
Gefrierschrank GN4113	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Stickstoffcontainer	tec-lab GmbH, Idstein
Gel-Kamera Olympus C4040Z	Olympus, Hamburg
Gel-Kammer Wide Mini Sub TM Cell	Bio-Rad, München
Heizblock DRI-BLOCK DB3	Techne, Jahnsdorf
Heizblock mit Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Horizontalschüttler HS 501 digital	IKA, Staufen
Inkubator	Jouan, Unterhachingen
Laminar Flow Arbeitsbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Laminar Flow Arbeitsbank Heraeus	Kendro, Hanau
Luminometer Lumat LB9501	Berthold, Bad Wildbad
Minishaker MS2	IKA, Staufen
Universalschüttler EM 60 mit Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sonoplus Ultrasonic Homogenizer HD3100	Bandelin electronic, Berlin
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spektrophotometer Smart Spec TM 3000	Bio-Rad, München
Thermocycler Personal Cycler	Biometra, Göttingen

Instrumente	Hersteller
Thermodrucker Mitsubishi P91D	Mitsubishi, Kyoto Japan
Transilluminator BioView	Biostep, Jahnsdorf
Transilluminator-Gehäuse	Biostep, Jahnsdorf
Waage LP2200	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Allegra™ 21R	Beckman Coulter, Fullerton USA
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Chemikalien, Puffer und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Cambrex Bio Science Rockland (Rockland, USA), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco (Karlsruhe), J. T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), PAA (Pasching, Österreich), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt [104]. Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) erworben.

Das verwendete Wasser stammt aus der Reinstwasseranlage (SG, Barsbüttel) des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Rostock.

2.1.2.1. Standardpuffer und -lösungen

6x Agarosegelprobenpuffer	50 mg	Bromphenolblau (1 mg/ml)
	100 mg	Xylencyanol FF (2 mg/ml)
	25 g	50 % Saccharose
	100 µl 0,5 M EDTA	1 mM EDTA pH 8,0
	Mit 50 ml ddH ₂ O auffüllen	
PBS (pH 7,4)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
10x TBE	54 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	Mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen	
TE	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	Mit 1.000 ml ddH ₂ O auffüllen, pH 7,3 mit NaOH einstellen, autoklavieren.	
LB-Agar-Platten	Für LB-Medium mit Antibiotika Zugabe von 100 µg/ml des jeweiligen Antibiotikums.	
	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	Mit 1.000 ml ddH ₂ O auffüllen, pH 7,3 mit NaOH einstellen, autoklavieren, auf 55 °C abkühlen lassen.	
	Nach Zusatz von 100 µg/ml des jeweiligen Antibiotikums auf Platten gießen.	

2.1.3. Kits

Name	Hersteller
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford USA
First Choice RLM-RACE-Kit	Ambion, Austin
HotStarTaqMasterMix	Qiagen, Hilden
Luciferase Assay System	Promega, Madison USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® SyBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® SyBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Riboprobe <i>in vitro</i> Transcription System	Promega, Madison USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4. Plasmide

Bezeichnung - Standardvektoren	Beschreibung / Quelle
pcDNA3	Klonierungsvektor mit CMV-Promotor zur Herstellung von Expressionsvektoren (Invitrogen)
pBlueScript SK+	Klonierungsvektor mit vielseitigen Klonierungsmöglichkeiten in der MKS (Stratagene)
pAdTrack-CMV	Expressionsvektor für Transgene unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit GFP; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. Pützer, Vektorologie und experimentelle Gentherapie
pGL3-Basic	Luciferase Expressionsvektor (Promega)

Bezeichnung - Genotypenplasmide	Beschreibung / Quelle
pCR [®] -XL-Topo [®] -HBV Genotyp A (HRO)	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp A; hergestellt in der Abteilung Virologie
pCR [®] -XL-Topo [®] -HBV Genotyp B (M)	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp B; hergestellt in der Abteilung Virologie
pCR [®] -XL-Topo [®] -HBV Genotyp C2TTA	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Subgenotyp C Variante TTA; hergestellt in der Abteilung Virologie
pCR [®] -XL-Topo [®] -HBV Genotyp D (Mongolei)	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp D; hergestellt in der Abteilung Virologie
pCR [®] -XL-Topo [®] -HBV Genotyp E (HRO)	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp E; hergestellt in der Abteilung Virologie
pNEB206A-HBV Genotyp F (adw4)	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp F; hergestellt in der Abteilung Virologie
pCR [®] -XL-Topo [®] -HBV Genotyp G	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp G; hergestellt in der Abteilung Virologie
pUC19-HBV Genotyp H	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp H; zur Verfügung gestellt von K. Abe, Japan
pUC19-HBV Genotyp I	Klonierungsvektor mit Gesamtgenom Genotyp I; zur Verfügung gestellt von K. Abe, Japan

Bezeichnung - HBxWt- und HBxPolyLysin- Ausgangsplasmide	Beschreibung / Quelle
pMT9T40A	Expressionsvektor mit der Gensequenz für das HBxWt-Protein des HBv-Genotyp C; hergestellt von C. H. Schröder (DKFZ, Heidelberg) [100].
pMT9T41A	Expressionsvektor mit einer natürlich vorkommenden Variante des HBx-Proteins unter Benutzung eines kryptischen Polyadenylierungssignals. Durch die Verkürzung des HBx-Proteins und dem Poly-Lysin-Schwanz stellt dies eine Variante des HBx-Proteins dar [100].

Bezeichnung - Transkriptionsfaktoren Ausgangsplasmide	Beschreibung / Quelle
pFLAG-CMV2	Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Transkription eines FLAG-Fusionsproteins (Sigma, München) zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe N. Hayashi, Japan
pFLAG-CMV2-E4BP4	Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Transkription eines FLAG-E4BP4-Fusionsproteins; zur Verfügung gestellt von N. Hayashi, Japan
pFLAG-CMV2-HLF	Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Transkription eines FLAG-HLF-Fusionsproteins; zur Verfügung gestellt von N. Hayashi, Japan
pFLAG-CMV2-FTF	Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Transkription eines FLAG-FTF-Fusionsproteins; zur Verfügung gestellt von N. Hayashi, Japan

2.1.5. Bakterienstämme

Die Bakterienstämme XL1-Blue Competent Cells, XL10-Gold® Ultracompetent Cells und BJ5183-AD-1 wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) wurde der Bakterienstamm Mach1™-T1^R verwendet.

Bakterienstämme	Genotyp
XL1-Blue Competent Cells	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)].
Mach1™-T1 ^R Competent Cells	F ⁻ ϕ 80(<i>lacZ</i>) Δ M15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> (confers resistance to phage T1)
XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]
BJ5183-AD-1 Electroporation Competent Cells	<i>endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR</i> (Strr) [pAdEasy-1 (Ampr)]

2.1.6. Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien stellen adhärent wachsende Zelllinien dar.

Zelllinie	Beschreibung/Quelle	Kulturmedium
HepG2	humane Leberzellkarzinomlinie, kein Beweis für integriertes HBV-Genom; ATCC-No.: HB-8065™	RPMI mit 10 % FKS und 1 % Streptomycin/Penicillin
HuH7-Lunet	humane Leberzellkarzinomlinie, hoch-differenziert, exprimiert HCV-Rezeptor. Cellbank-No.: JCRB0403	DMEM mit 10 % FKS und 1 % Streptomycin/Penicillin
WI38	humane Lungenfibroblasten; ATCC-No.: CCL-75™	DMEM mit 10 % FKS, 1 % Streptomycin/Penicillin, 1,2 µg/ml Amphotericin B und 1x MEM-NEAA

2.1.7. Adenoviren

Name	Beschreibung
AdGFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors [106]

2.1.8. Antikörper

Folgender Antikörper wurde für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eingesetzt.

Primäre Antikörper	Spezifität	Quelle	Spezifizierung
Anti-TBP	humanes TBP, AS 1 - 20	Abcam (Cambridge, Großbritannien)	monoklonal, Maus

2.1.9. Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) oder TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen und mit ddH₂O in einer Konzentration von 100 pmol/μl angesetzt und auf 10 pmol/μl als Arbeitslösung verdünnt. Die Angabe der Primer erfolgt in 5'→3'-Richtung.

Oligonukleotide zur Klonierung von C2-Plasmiden - Ganzgenom	
C2-1589-1660-C53-s	CTT CAC CTC TGC ACG TCG CAT GGA GAC CAC CGT GAA CGC CCA CCA GGT CTT GCC CAA GGT CTT ACA TAA GAG
C2-1825-1778Saclas	CAT GGT GCT GGT GAA CAG ACC AAT TTA TGC CTA CAG CCT
HBxSalI-s	ACG CGT CGA CCA TGG CTG CTA GGG TGT GC
C2-1825-1752-A62G64-Sacl-as	CTG GAG CTC TTC AAA AAG TTG CAT GGT GCT GGT GAA CAG ACC AAT TTA TGC CTA CAG CCT CCT AGT ACA AAG ACC TTT AAC CTA AT

Oligonukleotide zur Klonierung von C2-Plasmiden - partiell	
C-1590-1609s-Kpn	GGG GTA CCT TCA CCT CTG CAC GTC GCA T
C-1686-1667as-T1	CTT GCC ATG GCT GCG AGT CCA
C1653-NcoI	TTG CCA TGG CTG CGA GTC CAA GAG TCC TCT TAT GTA AGA CC

Oligonukleotide zur Identifizierung von Rap1A

RAP-241-260-s	CAGCACGACTTCTTCAAGTC
RAP-620-604-as	GCGGACTGGTAGCTCAG

Oligonukleotide zur Herstellung von Adenoviren

HBxPoA3xTGA	CCC AGG GTC AAT CAA TCA ATT TTT TTT TTT TTT T
HBxPolyA- <i>Hind</i> III	CCC AAG CTT ATG GCT GCT AGG GTG TGC TG
HBx- <i>Not</i> I-as	ATA AGA ATG CGG CCG CTT AGG CAG AGG TGA AAA AG
HBV1838-00 <i>Xho</i> II-as	CCG CTC GAG TTA GGC AGA GGT GAA AAA GTT GCA TGG TGC TGG TGA ACA

Oligonukleotide für ChIP-Analyse [1] und anderweitige Charakterisierungen (E4BP4-DNA-Nachweis [2] + Micorarray Voruntersuchungen [3])

ChIP1565-1581-s	ATC TGC CGG ACC GTG TG	[1] [2]
ChIP1784-1765-as	ACA GCC TCC TAG TAC AAA GA	[1]
ChIP1661-1679-s	GAC TCT TGG ACT CGC AGC A	[3]
ChIP1820-1801-as	GTT GCA TGG TGC TGG TGA AC	[3]
ChIP-as	ATGCCTACAGCCTCCTAGTACAAAGA	[2]

Oligonukleotide für RACE-Analyse

RACE Outer Primer	Sequenz unbekannt – Kit mitgeliefert
RACEou1833-1808-as	CAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTGCT
RACE-Adap-in-s	AACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGA
RACEin1804-1778-as	GAACAGACCAATTTATGCCTACAGCCT

2.1.10. Marker

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden folgende Marker verwendet.

Marker	Hersteller	Verwendung	Fragmente in bp
GeneRuler, 1-kB-DNA-Leiter	Fermentas	Fragmentgrößen- bestimmung	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250
GeneRuler, 100- bp-DNA-Leiter	Fermentas	Fragmentgrößen- bestimmung	1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1. DNA-Restriktion

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Die Restriktion von 1 µg genomischer bzw. Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten erfolgte mit 10 Enzymeinheiten des entsprechenden Restriktionsenzym im dafür vorgesehenen Restriktionspuffer. Die Inkubationszeit variierte dabei zwischen 2 h bis 14 h.

2.2.1.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten nach Restriktion sowie PCR. Da sich diese aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld gerichtet bewegen, lassen sie sich mit Hilfe einer Agarose-Gelmatrix ihrer Größe entsprechend auftrennen. Die Visualisierung der Nukleinsäurefragmente erfolgte unter UV-Licht mittels des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid. Die Auftrennung erfolgte in Agarosegelen bestehend aus 0,7 - 2 % Agarose (w/v), gelöst in 1x TBE-Puffer und mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 100 V für 20-90 min in einer mit TBE-Puffer gefüllten, horizontalen Gelkammer aufgetrennt. Als DNA-Größenstandards wurden die GeneRuler™ 100 bp und GeneRuler™ 1 kB DNA-Leiter (Fermentas) verwendet.

2.2.1.3. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu extrahierende DNA wurde mit einem sterilen Skalpell aus einem 0,7%igen (w/v) Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die weitere Extraktion erfolgte dann mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.2.1.4. Direkte Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die direkte Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR, Restriktionsverdau und Klenow- bzw. SAP-Behandlung wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwendet und dem mitgelieferten Protokoll gefolgt.

2.2.1.5. DNA-Polymerase I, Großes (Klenow) Fragment

Die DNA-Polymerase I – Großes Klenow Fragment (New England BioLabs, Frankfurt) stellt ein proteolytisches Produkt der *E. coli*-DNA-Polymerase I dar. Dieses hat die Polymerisations- und die 3'→5'-Exonukleaseaktivität behalten, aber die 5'→3'-Exonukleaseaktivität verloren hat. Vordergründig wurde in dieser Arbeit die 3'→5'-Exonukleaseaktivität der durch Restriktionsverdau entstandenen 5'→3'-DNA-Überhänge genutzt, um auf diese Weise *blunt*-Enden zu schaffen. Das Auffüllen von 5'-Überhängen durch die Polymerisationsaktivität erfolgte ebenfalls.

Dazu wurden dem Restriktionsansatz je 33 µM jedes dNTPs und 1 Unit Klenow pro Mikrogramm DNA hinzugegeben und dieser Ansatz für 15 min bei 25 °C inkubiert. Abschließend wurde die DNA wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben aufgereinigt.

2.2.1.6. Dephosphorylierung von Vektorfragmenten

Die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP; Fermentas, St. Leon-Rot) katalysiert unter anderem die Freisetzung von 5'- und 3'-Phosphatgruppen von DNA. Diese Reaktion wurde eingesetzt, um die Religation linearisierter Vektor-DNA zu verhindern und so die Integration eines gewünschten DNA-Fragmentes in diesen Vektor effizienter zu gestalten. Hierzu wurde die komplette aus den Agarosegelen eluierte DNA mit 10x SAP-Reaktionspuffer und 1 Unit pro µg DNA Shrimp Alkaline Phosphatase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 75 °C für 15 min.

2.2.1.7. Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit homolog-kohäsiven (*sticky ends*) bzw. glatten (*blunt ends*) Enden erfolgte im molaren Verhältnis 3:1 von Insert-DNA zu linearisierter Plasmid-DNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA mit der T4-DNA Ligase (New England Biolabs), dem zugehörigen Puffer sowie ddH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.1.8. Transformation durch Elektroporation

Zur Generierung von rekombinaten Adenovirusgenomen wurden BJ5183-AD-1 elektrokompente Zellen (Stratagene) verwendet. Diese Zellen besitzen das pAdEasy-1 Plasmid, welches für das Adenovirus-5 Genom kodiert. Durch

Rekombination mit einem AdEasy-Shuttlevektor, welcher das zu untersuchende Gen enthält, wurden rekombinante Adenovirusgenome hergestellt. Die Elektroporation erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Im Anschluss wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten aufgebracht und für 18 h bei 37 °C bebrütet.

2.2.1.9. Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Für die Transformation wurden je 2-5 µl des Ligationsansatzes verwendet. Nach dem Auftauen der chemisch-kompetenten XL1-Blue Zellen (Stratagene) auf Eis wurde der Ligationsansatz hinzugegeben und die Zellen für 40 min auf Eis inkubiert. Die nächsten Schritte umfassten einen Hitzeschock von 120 s bei 42 °C mit anschließender Abkühlung für 5 min auf Eis. Die Zellen wurden dann in 100 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Abschließend wurden die Proben auf LB-Agar-Platten (mit plasmid-spezifischen Antibiotikum) ausgestrichen und für 14 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.10. T/A-Klonierung

Zur T/A-Klonierung wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Dieses bietet eine schnelle Ein-Schritt-Klonierungsstrategie mit direkter Insertion der Taq-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkte in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO. Im Anschluss an die Klonierungsreaktion folgte die Transformation der chemisch-kompetenten One Shot[®] Mach1[™]-T1^R Zellen. Im Detail wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

2.2.1.11. Mini-Plasmidpräparation

Plasmid-Minipräparationen wurden zum Screening von Klonen nach Transformation eingesetzt. Dazu wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen) verwendet. Aufgrund der Reinheit der Präparationen konnten diese untersuchten Klone direkt sequenziert werden.

2.2.1.12. Maxi-Plasmidpräparation

Plasmid Maxipräparationen wurden mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Diese Methode liefert DNA von bis zu 500 µg pro Probe, welche aufgrund ihrer Reinheit ($OD_{A260/A280}$ 1,8 – 2,0) für Transfektionsuntersuchungen und weiterführende Klonierungen verwendet werden kann.

2.2.1.13. Herstellung von Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von bestimmten Bakterienkulturen wurden diese in Eppendorf-Röhrchen bei - 20 °C eingefroren. Dazu wurden je 1.000 µl der gewachsenen Bakterienkulturen mit 300 µl 87%igem Glycerin gemischt.

2.2.1.14. DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentrationen von DNA- und RNA-Präparationen wurde das Spektrophotometer Smart SpecTM3000 (Bio-Rad, München) eingesetzt. Dazu wurde DNA- bzw. RNA-Proben 1:100-verdünnt (5 µl der Probe in 495 µl ddH₂O) und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der Referenzwert von reinem Wasser wurde dabei automatisch abgezogen. Die Reinheit der Proben wurde anhand des Verhältnisses der Absorption von A₂₆₀/A₂₈₀ bestimmt, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen und der Quotient ein Maß für Verunreinigungen von Nukleinsäuren darstellt. DNA-Präparationen sollten dabei einen Reinheitsfaktor von 1,6 bis 2,0, RNA von 1,7 bis 2,0 aufweisen.

2.2.1.15. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein definierter Abschnitt einer DNA in mehreren Zyklen von Denaturierung, Annealing der Primer und Amplifizierung vervielfältigt. Um den jeweiligen Versuchsanforderungen gerecht zu werden, haben sich im Laufe der Jahre, aufbauend auf dem Grundprinzip von Mullis und Faloona [107], verschiedene PCR-Methoden entwickelt. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Methoden vorgestellt werden. Die hierfür verwendeten Reagenzien, mit Ausnahme der Primer und Sonden, wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Taq-PCR

Die Taq-PCR verwendet die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene thermostabile Taq-DNA-Polymerase. Der Vorteil der Taq-Polymerase liegt darin, dass sie während der Amplifikation eines DNA-Fragmentes ein zusätzliches Adenin an das 3'-Ende des synthetisierten Strangs hängt. Dieser 3'-Adenin-Überhang wird bei der T/A-Klonierung genutzt. Während der Amplifikation produziert die Taq-Polymerase teilweise Fehler, was zu Mutationen in der DNA-Sequenz führen kann. Um dies im Nachhinein auszuschließen, wurden die DNA-Amplifikate zur Kontrolle sequenziert.

Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm sahen wie folgt aus.

Komponenten	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
10x PCR-Puffer	5 µl	94 °C	3 min	
dNTP-Mix (je 10 mM)	4 µl	94 °C	1 min	} 30
Sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Primer-spez.	1 min	
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	72 °C	1 min	
Taq-Polymerase	0,5 µl	72 °C	10 min	
Template-DNA 1-1.000 pg	x µl			
ddH ₂ O	x µl			
Gesamtvolumen	50 µl			

HotStarTaq-PCR

Der Vorteil der HotStarTaq-DNA-Polymerase besteht in der höheren PCR-Spezifität und einer größeren Ausbeute an PCR-Produkten. Aktiviert wird die HotStarTaq-DNA-Polymerase durch einen 95 °C Inkubationsschritt für 15 min zu Beginn der PCR. Dieser verhindert die Formation von Primer-Dimeren und unspezifischen PCR-Produkten. Verwendung fand der HotStarTaq-Master Mix der Firma Qiagen (Hilden), welcher die HotStarTaq-DNA-Polymerase, den PCR-Puffer und die dNTPs beinhaltet.

Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm sahen wie folgt aus.

Komponenten	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
HotStarTaq Master Mix	25 µl	95 °C	15 min	
Sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	94 °C	1 min	} 30
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Primer-spez.	1 min	
Template-DNA 1-1000 pg	x µl	72 °C	1 min	
ddH ₂ O	x µl	72 °C	10 min	
Gesamtvolumen	50 µl			

Realtime-PCR

Die Realtime-PCR basiert auf der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber gleichzeitig die Quantifizierung der amplifizierten DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während des Zykluses. Die Fluoreszenz nimmt dabei mit der Menge der PCR-Produkte proportional zu.

Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm sahen wie folgt aus.

Komponenten	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
2x QuantiTect SYBR Green	25 µl	95 °C	15 min	
PCR Master Mix				
Sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	94 °C	1 min	30
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Primer-spez.	1 min	
Template-DNA	10 µl	72 °C	1 min	
ddH ₂ O	13 µl	Messung		
Gesamtvolumen	50 µl	72 °C	10 min	

RACE-PCR

Die RACE-PCR wurde im Anschluss an die RLM-RACE (siehe Kapitel: 2.2.2.5) durchgeführt, um die entstandenen Transkripte zu amplifizieren.

Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm sahen wie folgt aus.

Komponenten	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
HotStarTaq Master Mix	25 µl	95 °C	15 min	
Sense-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	94 °C	30 sec	45
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	55 °C	30 sec	
Template-DNA	1 µl	72 °C	5 sec	
ddH ₂ O	20 µl	72 °C	10 min	
Gesamtvolumen	50 µl			

Primer für: Nested 1: 5'RACE Outer Primer(s) / RACE-ou1838-08-as
Nested 2: RACE-Adap-in-s / RACE-in-1804-1778-as

Realtime RT-PCR

Die Realtime Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (Realtime RT-PCR) kombiniert die reverse Transkription der RNA mit der Realtime Polymerasekettenreaktion in nur einer PCR. Dazu wurde das QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

Das PCR-Programm und der PCR-Ansatz sahen wie folgt aus.

Komponenten	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
2x QuantiTect SYBR Green	25 µl	50 °C	30 min	
RT-PCR Master Mix				
Sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	95 °C	15 min	
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	94 °C	1 min	30
QuantiTect RT Mix	0,5 µl	Primer-spez.	1 min	
Template-RNA	10 µl	72 °C	1 min	
RNase-freies H ₂ O	12,5 µl	Messung		
Gesamtvolumen	50 µl	72 °C	10 min	

2.2.1.16. DNA-Präparation aus Zellkulturüberständen

Zur Extraktion von DNA aus freien Viruspartikeln im Zellkulturüberstand kam das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers zur Anwendung. Dafür wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Transfektion, je 200 µl Zellkulturüberstände abgenommen. Im Anschluss erfolgte die quantitative Analyse der synthetisierten verpackten HBV-DNA mittels Realtime-PCR.

2.2.2. RNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1. RNA Extraktion aus Leberbiopsiegewebe

Zur Gewinnung von RNA aus Leberbiopsien wurden je 0,1 g Gewebeprobe in einem Mörsergefäß mit flüssigem Stickstoff versetzt und solange mit dem Mörser zerkleinert bis sich das Gewebe zu weißem Pulver zersetzt hatte. Danach wurde dieses mit 2 ml TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und nochmals gemörsert, bis sich das weiße Pulver komplett in eine klare rote Flüssigkeit verwandelt hatte. Diese wurde in Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 13.000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt mit den oben beschriebenen Einstellungen und der Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Röhrchen. Die Überschichtung und das Mischen mit Chloroform wurden noch einmal wiederholt, danach für 5 min inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand

wurde im nächsten Schritt im Verhältnis 1 : 1 (v/v) mit Isopropanol versetzt, um die RNA zu fällen gemischt, 10 min inkubiert und zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol versetzt und bei 8.000 Upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet an der Luft für 5 - 10 min getrocknet, danach mit 20 µl Nuklease-freiem H₂O versetzt und für 3 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor es bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert wurde.

2.2.2.2. RNA-Präparation aus humanen Zellkulturen

Die RNA-Extraktion aus humanen Zellkulturen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Die Homogenisierung der Zellen wurde über die QIAshredder-Säulen durchgeführt. Zur Eliminierung der genomischen DNA-Kontamination erfolgte ein on-column DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden). Im Anschluss wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Qualitätskontrolle der extrahierten RNA erfolgte durch Auftrennung der ribosomalen RNA-Untereinheiten auf einem Agarosegel. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.3. Northern Blot

Die Analyse der viralen Transkripte erfolgte im Northern Blot. Dazu wurde die zu analysierende RNA in einem denaturierenden Agarosegel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine geeignete Trägersmembran transferiert. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, der RNA Sequenz komplementären DNA und der anschließenden Autoradiographie wird die Visualisierung und Quantifizierung der zu analysierenden RNA ermöglicht.

Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese

Um Kontaminationen durch RNasen zu verhindern, wurde alles benötigte Zubehör (Gelkammern und -schlitten) mit H₂O gewaschen, getrocknet und mit RNaseAway® (Roth, Karlsruhe) gereinigt. Für die Elektrophorese wurde ein 1,2%iges Formaldehyd-Agarosegel (1,2 g Agarose in 72 ml ddH₂O lösen, danach Zugabe von 18 ml Formaldehyd und 10 ml 10x RNA-Laufpuffer [200 mM MOPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7, sterilfiltriert]) verwendet. 10 µl der RNA-Proben wurden mit 40 µl Ladepuffer (5/4x RNA-Ladepuffer: 2,5 ml 10x RNA-

Laufpuffer, 12,5 ml Formamid, 4,25 ml Formaldehyd, 0,75 g Ficoll, 12,5 mg Xylene Cyanol und 12,5 mg Bromphenolblau) für 5 min bei 90 °C aufgeköcht, im Anschluss zentrifugiert und bis zum Probenauftrag auf Eis gestellt. Als Marker diente mit Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnittene HBV-DNA. Die Laufzeit des Gels betrug 90 min bei 100 V.

Kapillar-Blot

Der Kapillar-Blot schloss sich direkt an die Elektrophorese an. Dabei wurde für 16 h die RNA mit 10x SSC-Puffer (20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Na₃citrat x H₂O) auf eine PVDF-Membran geblottet und im Anschluss mit einem UV-Crosslinker fixiert.

Hybridisierung

Direkt nach dem Crosslinking wurde die getrocknete Membran in einer Schale zuerst mit 0,2 %, im Anschluss mit 2 % SSC-Puffer gewaschen. Die Prä-hybridisierung erfolgte dann in einer Schale mit 20 ml sterilfiltriertem, vorgewärmten Hybridisierungspuffer (6x SSPE [20x SSPE: 174 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄, 7,4 g EDTA und mit ddH₂O auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt], 10 % SDS, 200 mg/ml ssDNA und 50 % Formamid) im Wasserbad bei 59 °C für 5 h. Danach fand für 16 h bei 59 °C im Wasserbad die Hybridisierung mit der HBV-Gesamtgenomsonde statt, die folgendermaßen hergestellt wurde: 1 mg bereits mit *EcoRI* verdautes und aufgereinigtes pHB3Sp6 (HB3 = dreifaches HBV-Genom, Sp6 = unter der Kontrolle des Sp6-Promotor) wurde mit Hilfe des Riboprobe® in vitro Transcription System (Promega, Madison, USA) nach dem Herstellerprotokoll in einer 60-minütigen-Reaktion bei 37 °C ³²P-markiert. Die Aufreinigung der so hergestellten Sonden erfolgte über Quick spin RNA-Columns (Roche, Grenzach-Whylen). Danach wurde die Sonde sofort auf die Membran pipettiert.

Stringentes Waschen und Detektion

Die überschüssig und unspezifisch an die Membran gebundenen Sonden wurden durch Behandlung der Membran mit 20 ml 2x SSC (für 1 h 30 min bei RT) und einem zweifachem Waschschrift mit 20 ml hochstringenten 0,2x SSC (bei 65 °C für je 30 min) entfernt. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Detektion über 48 h mit Hilfe eines Röntgenfilms und der Entwicklung im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland).

2.2.2.4. Affymetrix-Microarray

Mit Hilfe von DNA-Microarrays ist es möglich mRNAs von mehreren tausend Genen parallel zu analysieren, um so mögliche Änderungen in der Aktivität (Expression) bestimmter Gene in Abhängigkeit verschiedenener Faktoren aufzuzeigen.

Die Proben wurden dazu wie folgt aufgearbeitet. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums der 6 cm-Zellkulturschalen wurden die adhärennten Zellen mit 10 ml PBS versetzt und mit einem Gummischaber geerntet. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 10 min bei 1.500 Upm ungekühlt zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und bei 3.000 Upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen, damit die Salze des PBS nicht mit den nachfolgenden Assaybedingungen interferierten. Pro Probe wurden 600 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden), versetzt mit 1 % Mercaptoethanol, zugegeben und mit Hilfe eines Vortexers resuspendiert. Die Lysate wurden bei -20 °C bis zur RNA-Extraktion eingefroren.

Die folgenden Schritte der RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, *in vitro*-Transkription, Fragmentierung der cRNA, Hybridisierung auf dem HGU133+2.0-Microarray (Affymetrix, Santa Clara, USA) und das Färben der Microarrays hat Herr Dr. Koczan (Institut für Immunologie, Universität Rostock) durchgeführt. Die durch das Scannen der Chips erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software GCOS1.4 und DataMining3.1 bearbeitet, anschließend in eine Excel-Tabelle exportiert und ausgewertet.

Es wurde eine vergleichende Analyse zur Bestimmung der Signalwerte vorgenommen, wobei die Messdaten eines Chips als Basislinie definiert und die Werte eines zweiten Chips (experimenteller Chip) als Differenz zur Basislinie berechnet wurden. Weiterhin wurde die *Fold Change* (= x-fache Änderung) berechnet, welche eine quantitative Beurteilung der differenziellen Genexpression darstellt.

Gene wurden als induziert gewertet, wenn sie in zwei unabhängigen Experimenten mindestens zweifach induziert waren (im Vergleich zur Zellkultur). Der nächste Schritt betrachtete ausschließlich die Gene, die in beiden Experimenten (Doppelansatz) als konstitutiv höher exprimiert eingestuft wurden und bei denen der Mittelwert des Signals der Proben mindestens fünffach höher war als der Mittelwert des Signals der Vergleichsproben.

Die graphische Darstellung der Signalwert-Vergleiche erfolgte in einem Streudiagramm. Die Ergebnisse wurden dabei logarithmisch aufgetragen. Die Farbgebung der Signalwerte fand auf Basis der *Detection call*-Berechnungen statt. Diese weisen darauf hin, ob ein Transkript bzw. ein Gen detektiert („present“), grenzwertig („marginal“) oder nicht detektiert („absent“) wird. Die Wahrscheinlichkeit/Zulässigkeit des *Detection calls* wird durch den p-Wert angegeben. Mittels diagonaler Linien ist die Reprimierung oder Induzierung der Gene um das 2, 10 oder 30fache dargestellt.

Die Korrespondenzanalyse stellt ein Analyseverfahren zur Auswertung multidimensionaler Daten dar. Dabei bildet die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis (PCA)*) den ersten Schritt. Auf diese Weise können in der Microarraydatenanalyse Zusammenhänge zwischen den Microarrays festgestellt werden. Dabei wird jeder Microarray (= graphisch als Kugel gekennzeichnet) in einem 54.676-dimensionalen Raum durch die 54.676 Vektoren des Arrays (= jeder Vektor entspricht dem Signalwert für ein Gen) bewegt. Dieses Ergebnis wird dann in einen 3-dimensionalen Raum geplottet, um so die Zusammenhänge der einzelnen Microarrays vereinfacht darzustellen.

2.2.2.5. RNA Ligase Mediated Rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE)

Die Rapid amplification of cDNA ends (RACE) stellt eine PCR-basierende Methode dar, welche die Klonierung von Vollängen-cDNA-Sequenzen ermöglicht, wenn ausschließlich Teile der cDNA-Sequenz bekannt sind. Aufbauend auf diese klassische RACE [108, 109] wurde die RNA Ligase Mediated (RLM)-RACE entwickelt, welche im FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion, Austin) zum Einsatz kommt und ausschließlich cDNA von Vollängen-capped mRNA amplifiziert (Abbildung 2-1).

Dabei wird zu Beginn die Gesamt-RNA einer CIP-Behandlung unterzogen um so 5'-Phosphate von degradierten mRNAs, tRNAs und DNA zu entfernen. Daran schließt sich eine TAP-Behandlung an um die Caps der Vollängen-mRNA zu entfernen. Im nächsten Schritt wird der mitgelieferte 5'-RACE-Adapter an die decapped mRNA ligiert. An die reverse Transkription schließt sich eine nested-PCRs an (Abbildung 2-2).

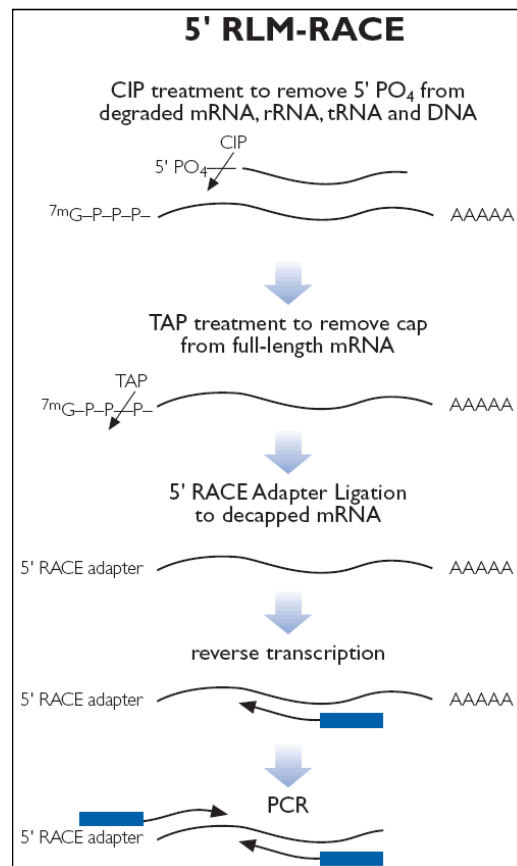


Abbildung 2-1: Überblick über die RLM-RACE Methode. mRNA: messenger RNA; rRNA: ribosomal RNA; tRNA: transfer RNA; DNA: deoxyribonucleic acid; CIP: Calf Intestine Alkaline Phosphatase; TAP: Tobacco Acid Pyrophosphatase.

Dazu liefert das Kit zwei nested-Primer, welche jeweils eine der 5'-RACE Adapter-Sequenz entsprechende Sequenz aufweisen. Die beiden antisense Primer sind dagegen sequenzspezifisch.

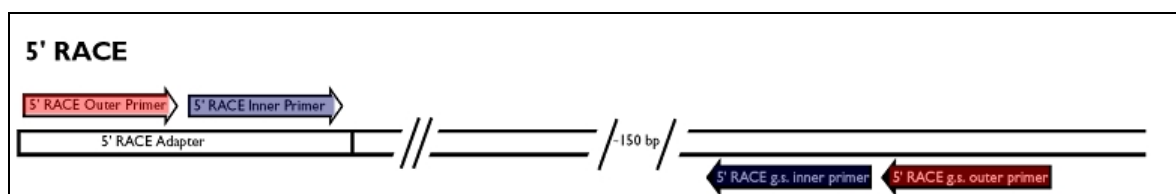


Abbildung 2-2: Primerpositionen der 5'-RACE. Dargestellt sind die Primerpaarungen der nested-PCR an dem 5'-RACE Adapter-cDNA-Transkript. Rot = nested-PCR 1, blau = nested-PCR 2. hellrot und -blau die 5' RACE-Adapter spezifischen Primer, dunkelrot und -blau die Zielsequenz-spezifischen Primer. Modifiziert nach „FirstChoice RLM-RACE Kit“.

Die PCRs wurden im Anschluss wie in Kapitel 2.2.1.15 beschrieben durchgeführt und die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Abschließend wurden die PCR-Produkte wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben aus dem Gel extrahiert und TA-kloniert (Kapitel 2.2.1.10).

2.2.3. Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der aus dem Zelllysat gewonnenen Proteine wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay (Pierce, Rockford USA) bestimmt. Anhand eines parallel mitgeführten *bovine serum albumine* (BSA)-Standards wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt. Dazu wurden 100 µl jeder Probe und jedes Standards mit 2 ml eines Working Reagent (WR, Reagenz A : B = 50:1) gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Abschließend sind die Proben auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und bei einer Extinktion von 562 nm im Eppendorf BioPhotometer (Hamburg) gemessen worden.

2.2.3.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

HBsAg und HBeAg in den Zellkulturüberständen wurden mittels des AxSYM® Systems (Abbott, Wiesbaden) nachgewiesen. Das Prinzip der Messung beruht auf einem Mikropartikel-Enzymimmunoassay, bei dem mit monoklonalen anti-HBs bzw. anti-HBe beschichtete Mikropartikel verwendet werden.

Zur Auswertung von HBeAg wurde die S / CO-Ratio, d. h. die Extinktion der Probe dividiert durch die Extinktion des Grenzwertes, herangezogen. Ist der gemessene Wert größer als 1,0 S / CO, wird die Probe als reaktiv, ist sie kleiner als 1,0 S / CO, als negativ bewertet. Die S / N-Ratio, d. h. die Extinktion der Probe, dividiert durch die Extinktion des Kalibrationswertes, wurde zur Beurteilung von HBsAg angewandt. Um im aussagekräftigen linearen Bereich der Tests zu bleiben, wurden die Proben je nach Bedarf pur oder 1:10 verdünnt eingesetzt.

Von jeder Probe wurde je Ansatz und Zeitpunkt 400 µl Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert. Vor der Analyse wurden die Proben aufgetaut und einmal 30 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um überflüssiges Zellmaterial zu entfernen. Der Überstand wurde dann im ELISA zum semiquantitativen Nachweis sowohl von HBsAg als auch HBeAg verwendet.

2.2.3.3. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde verwendet um die spezifische Bindung von Proteinen an die virale DNA *in vivo* nachzuweisen. Das Protokoll von Nelson *et al.* war dafür Arbeitsgrundlage [110].

48 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung der Protein-DNA-Komplexe mittels Formaldehyd-Crosslinking. Im Anschluss wurde das Chromatin durch Ultraschall (4 x 15 s Impulse) in 200-1.000 bp große Fragmente zerschnitten. Die DNA-Stücke, welche das gewünschte Protein gebunden haben, wurden mit einem für dieses Protein spezifischen Antikörper präzipitiert. Im Anschluss wurden die isolierten Protein-DNA-Komplexe gelöst. Mit Hilfe einer PCR und der für die vermutete DNA-Region spezifischen Primern kann der Bindungsort im Genom nachgewiesen werden.

2.2.4. Nachweis von Viruspartikeln

Für die Analyse der HBV-Replikation wurde HBV-DNA aus den extrazellulär akkumulierten HBV-Kapsiden isoliert und mittels Southern Blot [111] untersucht. Diese Aufgabe übernahm das Laboratoire de Virologie Moléculaire, Institut National de la Transfusion Sanguine in Paris (Frankreich) durchgeführt.

2.2.5. Sequenzanalyse

Die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) führte die notwendigen Sequenzierungen durch. Dazu wurden je 1 µg DNA inkl. 10 pmol Primer gemischt, eingedampft und per Post verschickt. Die Sequenzen wurden mit den Programmen EditSeq und MegAlign des Software-Paketes DNASTAR ausgewertet.

2.2.6. Zellkulturarbeiten und Transfektion

2.2.6.1. Allgemeine Zellkultur

Die langfristige Lagerung von Zelllinien erfolgte im flüssigen Stickstoff. Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml frisches Medium überführt, bei 64 x g (Allegra™21R, Beckman Coulter) und Raumtemperatur für 3 min sedimentiert und das so entstandene Zellpellet in frischem Medium gelöst und in Zellkulturflaschen überführt. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator (Labotect, Göttingen) bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Medium wurde um 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS, Gibco) und 100 µg/ml Penicillin / Streptomycin ergänzt.

Die Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen mit 40 ml Zellkulturmedium kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Hierzu

wurden sie kurz in 1x Trypsinlösung geschwenkt und für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen von der Flaschenwand und der Resuspension in Medium wurden die Zellen im Verhältnis 1 : 3 in 250 ml-Kulturflaschen ausgesät.

2.2.6.2. Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblaufärbung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die BÜRKER-Zellzählkammer genutzt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 80 µl PBS und 10 µl Trypanblau gemischt. Davon wurden 10 µl in die Zählkammer einpipettiert und die vitalen, den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmenden, Zellen gezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mittels der folgenden Formel:

$$\text{Durchschnittliche Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

2.2.6.3. Transiente Transfektion von Zellen mit TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent

Um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden die Zellen mit TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas) transfiziert. Dabei formt das kationische Polymer stabile positiv-geladene Komplexe mit der DNA. Diese Komplexe schützen die DNA vor Degradation und erleichtern so den Gentransfer in die Zelle.

3×10^5 , 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$ bzw. 5×10^6 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 6-Lochplatten, 6 cm-, 10 cm- oder 14,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät und in 1,6, 4, 7 bzw. 10 ml Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Zur Transfektion wurde die dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechende DNA-Menge in serumfreiem Medium verdünnt, mit je 2 µl TurboFect™ pro 1 µg zu transfizierender DNA versetzt und gemischt. Zur Bildung von TurboFect™-DNA-Komplexen folgte im Anschluss, eine Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur, während der die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt wurden. Abschließend wurde der DNA / TurboFect™-Mix tropfenweise auf die Zellen gegeben, welche leicht geschwenkt und dann im CO₂-Brutschrank bei 37 °C bis zur Analyse inkubiert wurden.

2.2.6.4. Luciferase-Assay

Die Quantifizierung der Promotor-Aktivität allein bzw. im Zusammenspiel mit Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels Bestimmung der Aktivität der Firefly-Luciferase. Da die Stärke der Expression des Luciferase-Gens von vorgeschalteten Promotor- / Enhancerelementen kontrolliert wird, ist die gemessene Enzymaktivität ein direktes Maß für die Beeinflussung der Transkriptionsrate dieser Elemente durch zu untersuchende Faktoren, wie z. B. der Interaktion von DNA mit Transkriptionsfaktoren. Dazu wurden je 3×10^5 Zellen je Ansatz in 6-Lochzellkulturschalen eingesät und mit dem jeweiligen Luciferase-Reporterplasmid sowie den entsprechenden Expressionsplasmiden kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Aufarbeitung der Zellen in der Form, dass das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 400 µl Reporter Lysepuffer (RLB) überschichtet wurden. Die Zellen wurden dann bei 4 °C für 60 min eingefroren. Nach dem Wiederauftauen und dem Lösen der Zellen (mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale) wurden sie in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, das Lysat für 10 s auf dem Vortex gemischt und bei 12.000 x g (Eppendorf 5417R) und 4 °C in 10 min pelletiert. Vom Überstand wurden je 10 µl in den BCA Protein Assay (Kapitel 2.2.3.1) zur Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge eingesetzt. Je 10 µg Gesamt-Protein wurden in ein Luminometer-Messröhrchen überführt und die Lumineszenz nach automatischer Zugabe des Luciferase-Substrates (Promega, Mannheim) im Luminometer (Lumat LB9501, Berthold Technologies, Bald Wildbad) gemessen. Dabei katalysiert die Firefly-Luciferase die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm. Der Messwert wurde in RLU (*relative light units*) angegeben.

2.2.7. Adenovirale Arbeitstechniken

2.2.7.1. Transduktion

Die Transduktion mit Ad-Vektoren erfolgte in WI38- und HepG2-Zelllinien. Dazu wurde im ersten Schritt das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt. Als nächstes wurden die Vektoren unter Berücksichtigung der Zellzahl sowie des Virustiters in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Nach einer 30minütigen Transduktion bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen mit Medium wieder aufgefüllt. Die Transduktion erfolgte für jede Zelllinie mit der entsprechenden Infektionsmultiplizität (MOI – *multiplicity of infection*), damit eine 100%ige Transduktion der Zellen erreicht werden konnte (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Infektionsmultiplizität der verschiedenen Zelllinien.

Zelllinie	MOI
HepG2	60
WI38	10

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Genotypen A bis I

Die Klassifikation des Hepatitis-B-Virus, des human-pathogenen Hepadnavirus, erfolgt zurzeit in 10 Genotypen. Diese HBV-Genotypen unterscheiden sich um mindestens 7,5 % ihrer Genomsequenz [67] und werden entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung alphabetisch von A bis J nummeriert. HBV-Genotypen zeigen nicht nur eine unterschiedliche geographische Verteilung, sondern besitzen ebenfalls einen Einfluss auf die HBeAg-Serokonversionsrate, Mutationsmuster und die Schwere der Lebererkrankung, was zu einem unterschiedlichen Ansprechen des Patienten auf die jeweilige Behandlung führen kann. Mit dieser Arbeit sollen erstmals neun von zehn Genotypen vergleichend untersucht werden. Der zehnte Genotyp J lag zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht im Labor zur Analyse vor. Untersucht wurden die Parameter HBsAg, HBeAg und HBV-Replikation anhand des HBV-DNA-Nachweises und deren Konzentration nach Transfektion linearisierter HBV-Monomere. Dazu haben Günther *et al.* eine Methode zur Herstellung replikationskompetenter HBV-Monomere entwickelt [105]. Dabei wird aus dem Serum eines Patienten das HBV-Genom amplifiziert und anschließend in einen beliebigen Vektor mit den passenden Restriktionsschnittstellen oder über T/A-Klonierung kloniert. Mittels *SapI*-Restriktion des Plasmids wird das HBV-Genom linearisiert. Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgt die Transfektion in die Zielzelle. Dort können sich die linearisierten HBV-Monomere selbst ligieren. In Folge dessen kommt es zur Produktion zirkulärer HBV-DNA und somit zur Replikation des Virus mit einhergehender Herstellung des Virus in der Zelle. Der Nachweis erfolgt durch eine Messung der Antigene im Überstand.

Dazu wurden von jedem Genotyp je 1 µg linearisierte HBV-Monomere in HepG2-Zellen transfiziert (Kapitel 2.2.6.3). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein *enhanced* grünfluoreszierendes Protein (eGFP) enthaltendes Plasmid kotransfiziert. Zum Zeitpunkt der Probennahme nach 5 Tagen konnte anhand des über alle Proben gleichmäßig verteilt leuchtenden eGFPs eine einheitliche Transfektionseffizienz nachgewiesen werden. Die Zellkulturüberstände wurden zur Bestimmung von HBsAg, HBeAg, HBV-Replikation und Virusproduktion (anhand des Nachweises von Virionen und Nukleokapsiden) abgenommen. Zusätzlich

wurden die jetzt mediumfreien Zellen mit Phosphat Buffered Saline (PBS) gewaschen, geerntet, pelletiert und das Pellet mit Lysepuffer versetzt. Nach einem abschließenden Vortex-Schritt konnten die Proben zur Bestimmung der intrazellulären Werte für HBsAg, HBeAg und DNA-Konzentration verwendet werden.

3.1.1. HBsAg- und HBeAg-Nachweis extra- und intrazellulär

Die Gesamtheit der Oberflächenproteine bildet das sogenannte HBs-Antigen (HBsAg), das Bestandteil der Virushülle ist, aber ebenfalls zum Großteil als sphärische oder filamentöse nichtinfektiöse HBsAg-Partikel von infizierten Zellen sezerniert wird. „reaktiv“ auf extrazelluläres HBsAg getestet wurden die Genotypen A, B, C(TTA), F, G und H, wohingegen die Genotypen D und E „grenzwertig“ und die Genotypen C und I als „nicht-reaktiv“ beurteilt wurden (Abbildung 3-1). Auf intrazelluläres HBsAg getestet, wurden alle Genotypen als „reaktiv“ bewertet, mit Ausnahme der Genotypen G und I, die als „grenzwertig“ einzustufen waren (Abbildung 3-2).

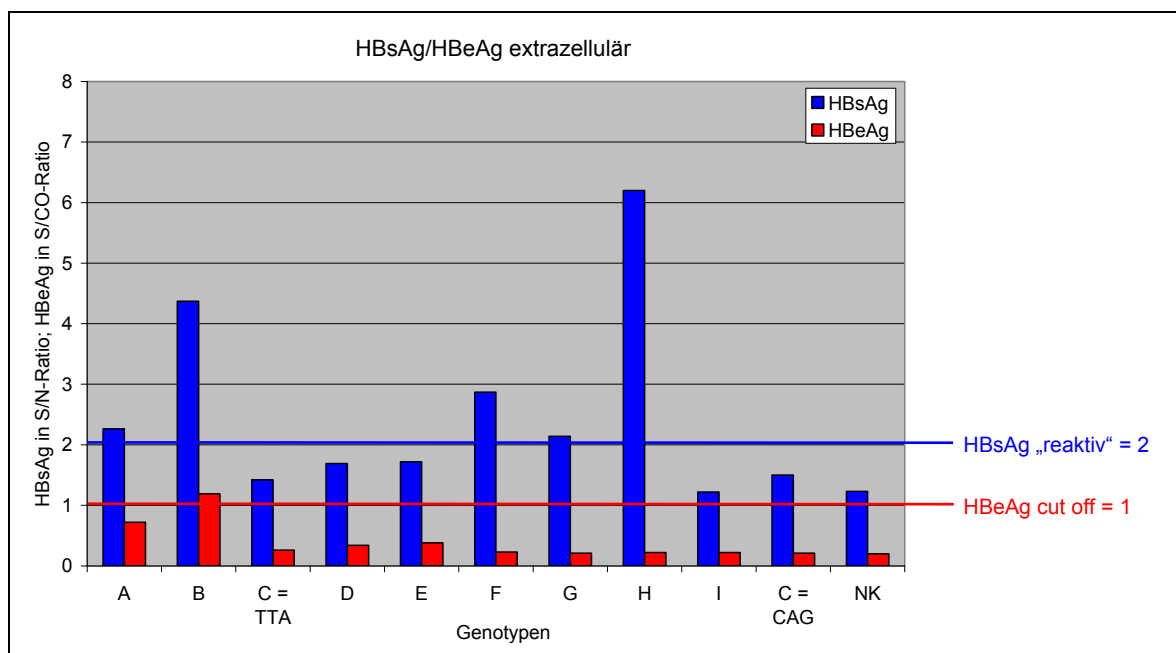


Abbildung 3-1: Bestimmung von extrazellulärem HBsAg und HBeAg. Die Analyse erfolgte mittels ELISA. Dazu verwendete Zellkulturüberstände entstammen transienten Transfektionen von je 1 µg linearisierter HBV-DNA der jeweiligen Genotypen. Die Probennahme erfolgte nach 5 Tagen. Dargestellt sind S / CO-Ratios (Probe : Grenzwert) für HBeAg von unverdünnten Proben. Werte >1 sind „reaktiv“. In S / N-Ratios (Probe : Kalibratormittelwert) wurden die Werte für HBsAg angegeben. Dabei sind Proben <1,6 „nicht-reaktiv“, ≥2 „reaktiv“ und dazwischen liegende „grenzwertig“. NK = Negativkontrolle, Material transfizierter Zellen mit leerem pcDNA3-Vektor. n = 1.

Weiterhin wurde das Auftreten des Hepatitis B e Antigens untersucht. Extrazellulär wurde ausschließlich der Genotyp B HBeAg „reaktiv“ beurteilt (Abbildung 3-1). Intrazellulär konnte kein HBeAg nachgewiesen werden, da dieses im Anschluss an seine Produktion von der Zelle sezerniert wird (Abbildung 3-2). Normalerweise würde dieses dann im Blut zirkulieren und dort serologisch nachweisbar sein [112]. Im Serum scheint es immunregulatorische Funktionen auszuüben, indem es T-Zell-Toleranz auslöst und damit auch eine HBcAg-spezifische zytotoxische T-Zellantwort hemmt [16, 17].

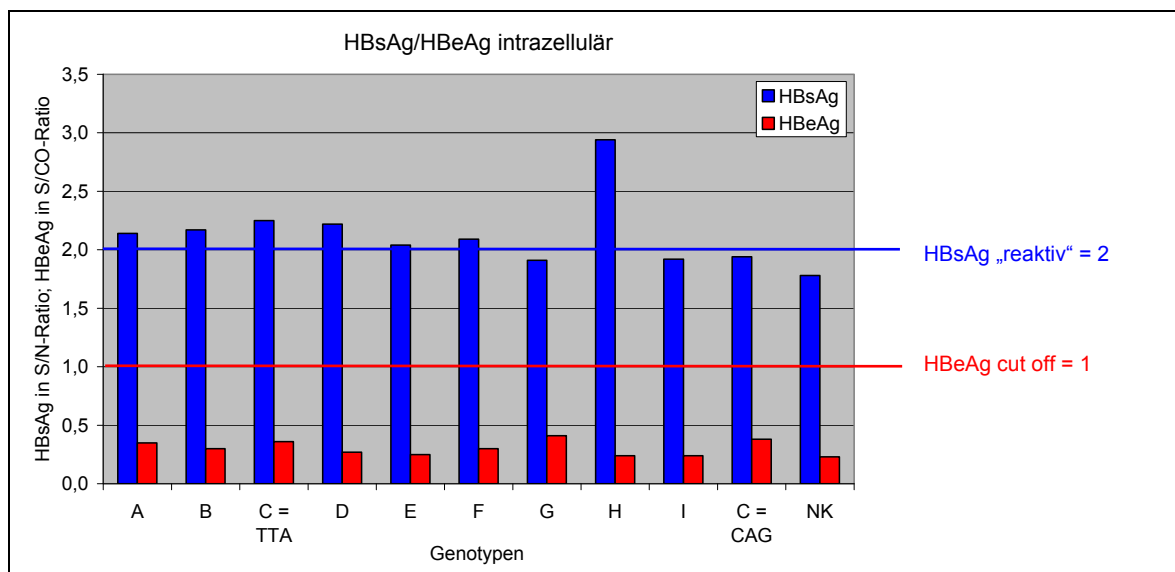


Abbildung 3-2: Bestimmung von intrazellulärem HBsAg und HBeAg. Fünf Tage nach Transfektion der linearisierten HBV-DNA der jeweiligen Genotypen wurden die HepG2-Zellen geerntet und bei -80°C schockgefroren. Im Anschluss wurden die Zellen gevortext, 30 min pelletiert und der Überstand 1:10-verdünnt dem ELISA-Test zugeführt. HBeAg-„nicht-reaktiv“ sind alle Proben mit einer S / CO-Ratio <1. Für HBsAg gelten die folgenden Grenzwerte: <1,6 „nicht-reaktiv“, >2 „reaktiv“ und 1,6> - <2,0 „grenzwertig“. Die Transfektion mit dem leeren Vektor pcDNA3 diente als Negativkontrolle = NK. n = 1.

Bis auf die Genotypen C und G sollten entsprechend der Sequenzanalyse alle anderen Genotypen HBeAg positiv sein. Das Isolat des Genotyp C wurde von einem Patienten gewonnen, welcher offensichtlich im Langzeitverlauf der chronischen HBV-Infektion eine HBeAg-Serokonversion mit Verlust von HBeAg aufwies. Genotyp G besitzt im Gegensatz zu den anderen Genotypen an der Nukleotidposition 1896 einen Austausch von Guanin (G) zu Adenin (A), welcher eine der häufigsten PräCore-Mutationen (G1896A) darstellt und so zu einem Verlust der HBeAg-Produktion führt. Dieses durch die Mutation entstehende translationale Stoppkodon hat zur Folge, dass die Translation des PräCore-

Proteins vorzeitig abgebrochen und kein HBeAg gebildet wird. Alle übrigen Isolate sollten theoretisch HBeAg produzieren. Wahrscheinlich haben noch weitere Faktoren Einfluss auf die HBeAg-Produktion. Dass das HBeAg in diesem Versuch unter der Nachweisgrenze liegt ist jedoch nicht ungewöhnlich, da es selbst im natürlichen Infektionskontext nur in sehr geringen Mengen sezerniert wird.

3.1.2. Nachweis der Replikation anhand sezernierter HBV-DNA

Zum Nachweis der Virusreplikation durch quantitative Messung sezernierter, partikel-assoziiierter HBV-DNA wurde diese aus den Zellkulturüberständen extrahiert. Dabei sezernieren stark replizierende Genotypen mehr DNA in den Zellkulturüberstand als schwach replizierende. Die mittels semi-quantitativer PCR gemessenen DNA-Konzentrationen bewegen sich, bis auf drei Ausnahmen, alle im Bereich zwischen 1×10^6 und 8×10^6 Kopien / ml (Abbildung 3-3). Die Genotypen B, D und G besitzen eine fast identische Kopienzahl mit Werten um die 4×10^6 . Die Genotypen A und C(CAG) (circa 3×10^6), H (2×10^6) und E (1×10^6) weisen ebenfalls Werte über 1×10^6 auf. Zwei Ausnahmen hingegen sind die Genotypen F und I mit Werten von 6×10^5 , welche somit vergleichsweise wenig partikel-assoziierte HBV-DNA in den Zellkulturüberstand sezernieren. Der Genotyp C(TTA) zeigt die mit Abstand stärkste Replikation (8×10^6) aller Genotypen.

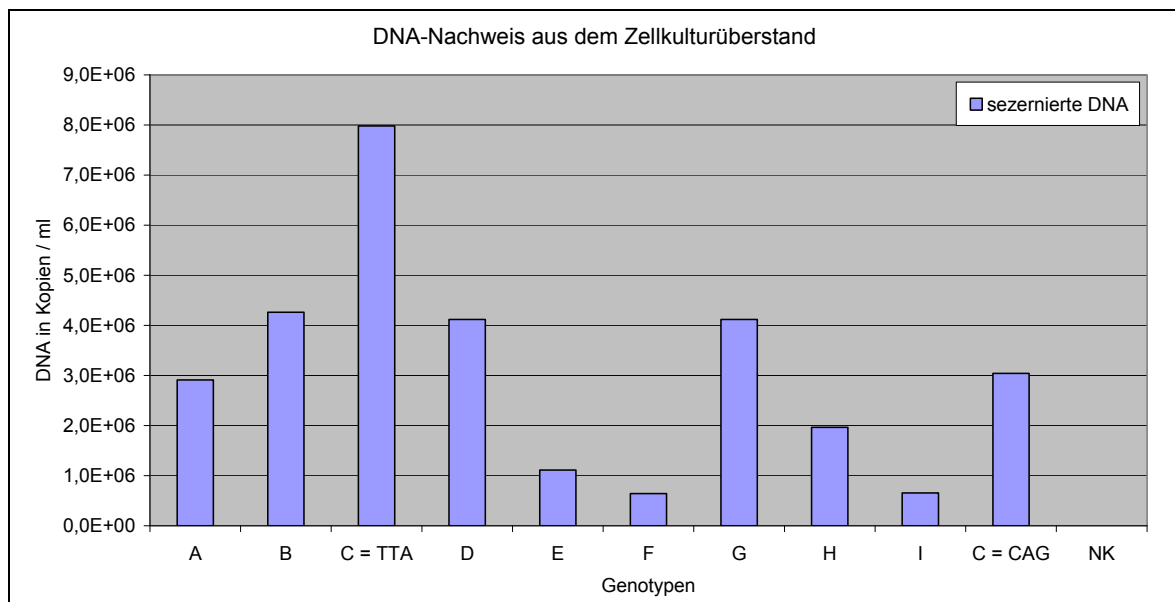


Abbildung 3-3: Analyse der differentiellen Replikation der Genotypen. Die Replikation wurde anhand der im Zellkulturüberstand mittels Realtime-PCR gemessenen DNA quantitativ bestimmt. Dazu wurden dieselben Zellkulturüberstände verwendet, wie zur Bestimmung der extrazellulären HBs- und HBeAg-Konzentrationen. Aufgetragen wurde die DNA in Kopienzahl / ml. Als NK = Negativkontrolle wurde der leere pcDNA-Vektor transfiziert. n = 1.

3.1.3. Nachweis von Virionen und Nukleokapsiden

Im nächsten Schritt sollte nachgewiesen werden, dass HBV-Viruspartikel oder/und nackte Nukleokapside gebildet werden. Falls dies nachgewiesen werden kann, sollte weiterhin untersucht werden, ob Unterschiede im Mengenverhältnis HBV-Viruspartikel zu Nukleokapsid der einzelnen Genotypen zu sehen sind. Dieser Versuch wurde im Laboratoire de Virologie Moléculaire, Institut National de la Transfusion Sanguine in Paris von Herrn Dr. Camille Sureau durchgeführt. Dafür wurden 15 ml der Zellkulturüberstände nach Paris versandt und dort aufgearbeitet.

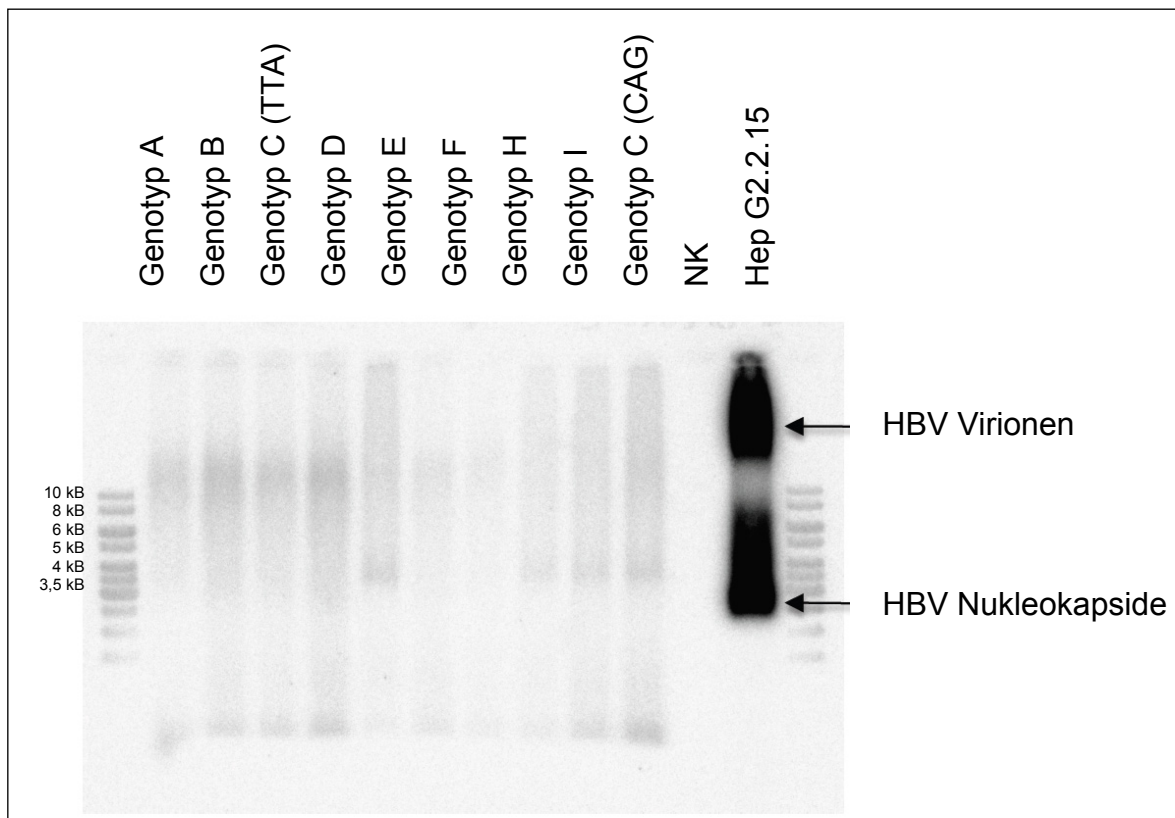


Abbildung 3-4: Nachweis von Virionen. Dargestellt ist das Phosphorimager-Bild einer Nylonmembran, auf welche die mittels 0,7%igen Agarosegel getrennten Genotypen-Proben geblottet wurden. Untersucht wurden die Genotypen A-I, inklusive des Genotyps C2 mit den Basenkonstellationen TTA und CAG. Als Positivkontrolle diente aus HepG2.2.15 extrahiertes Probenmaterial, welches DNA-Banden auf Höhe der Virionen und HBV-Nukleokapside aufweist. NK = Negativkontrolle.

Wie Abbildung 3-4 zeigt, weist die Positivkontrolle (aus HepG2.2.15-Zellen gewonnene Partikel) eindeutig detektierbare Banden HBV-DNA an den Positionen der nackten Kapside und der umhüllten Virionen auf. Die einzelnen Proben hingegen weisen nicht so eindeutige Banden auf. Je zwei schwache Signale sind

bei allen Genotypen zu sehen, was möglicherweise auf eine schwache Freisetzung sowohl von Virionen als auch von nackten Kapsiden hinweist. Die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Banden ist jedoch geringfügig abweichend von der der Positivkontrolle. Da diese Genotyp D entspricht, sollte sie ein prinzipiell ähnliches Laufverhalten aufweisen wie die Genotyp D-Probe. Die Genotypen A und G weisen Insertionen von 2 bzw. 12 AS im HBc-Gen auf. Diese Insertionen könnten Veränderungen in der Größe des Kapsides verursachen. Anhaltspunkte dafür können aber an Hand dieser Abbildung nicht gefunden werden. Die untere Bande läuft auf Höhe der 3,5 kB-Markerbande. Möglicherweise stellt diese Bande die unverpackte DNA dar, wohingegen die obere Bande inkomplett umhüllte Kapside widerspiegelt. Weiterhin kann man Unterschiede beim Mengenverhältnis der oberen zur unteren Bande der einzelnen Genotypen beschreiben. So weisen die Genotypen H, I und die Probe C(CAG) stärkere kleine Banden als große Banden auf. Genotyp G besitzt zwei annähernd gleich starke Banden, wohingegen bei den Genotypen A, B, C(TTA), D, E und F die obere Bande markanter hervortritt. Abschließend kann festgestellt werden, dass mittels dieses Versuches zumindest ein teilweises Anlaufen der Replikation aufgezeigt werden konnte.

3.2. Subgenotyp C2

Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Genotypen des Hepatitis-B-Virus weiter in Subgenotypen unterteilt werden können. Subgenotypen unterscheiden sich um mindestens 4 % ihrer Genomsequenz [113] und variieren substanziell in vielen virologischen und wahrscheinlich auch einigen klinischen Parametern. Die in Asien überwiegend vorherrschenden Genotypen sind B und C. Bislang sind für diese beiden Genotypen jeweils sieben Subgenotypen beschrieben worden. Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigte sich mit dem Subgenotyp C2, welcher vornehmlich in Ost-Asien, einschließlich Japan und China zu finden ist [114]. Das C2-HBV-Genom eines aus Shanghai, China, stammenden chronisch infizierten HBV-Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom (HCC) wurde dazu amplifiziert, sequenziert und in die ncbi-Datenbank unter der Accession-Nummer GU385774 eingetragen. Zur genaueren Untersuchung der Probe wurde diese HBV-DNA kloniert. Dazu wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien angewandt, welche, den jeweiligen Ergebnissen

zugeordnet, beschrieben werden. Charakteristisch für diese Patientenprobe und den Verlauf einer chronischen viralen Infektion mit anschließender Entwicklung eines HCC ist das Auftreten einer Reihe von Mutationen im HBV-Genom. Mutationen im basalen Core-Promotor (BCP) bei den Nukleotiden (nt) 1762 und nt 1764 (T1762/A1764) und in der PräCore-Region bei nt 1896 (A1896) sind assoziiert mit der HBeAg-Serokonversion und einer persistierenden Virusreplikation. Bei HBeAg-negativen Patienten wird die Mutation T1653 in der Box α Region in Zusammenhang mit der Zunahme des Risikos an HCC zu erkranken gebracht [91]. Diese vier Mutationen (C1653T, A1762T/G1764A und G1896A) sind in der bearbeiteten Patientenprobe zu finden. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konzentrierten sich auf die möglicherweise auftretenden Unterschiede im Replikationszyklus verschiedener Mutationskombinationen natürlich vorkommender Varianten.

3.2.1. Klonierung der vier Subgenotyp C2-Varianten

In der vorliegenden Arbeit sollten die in Tabelle 3-1 aufgeführten vier natürlich vorkommenden Varianten des Subgenotyps C2 untersucht werden. Diese Varianten unterscheiden sich ausschließlich in 3 Basenaustauschen, wobei der Basenaustausch an den Positionen nt 1762 und nt 1764 immer miteinander einhergehen (= Doppelmutation).

Tabelle 3-1: In der Arbeit verwendete Varianten des Subgenotypes C2.

Name	Basenaustausch im HBV-Genom an Position		
	1653	1762	1764
CAG	C	A	G
CTA	C	T	A
TAG	T	A	G
TTA	T	T	A

Die Varianten wurden auf Basis der oben beschriebenen chinesischen Patientenprobe des Subgenotypes C2 mit der Nukleotidmutations-Kombination TTA durch Einfügen von Punktmutationen kloniert. Die dazu verwendeten Klonierungsstrategien sind in Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 schematisch dargestellt.

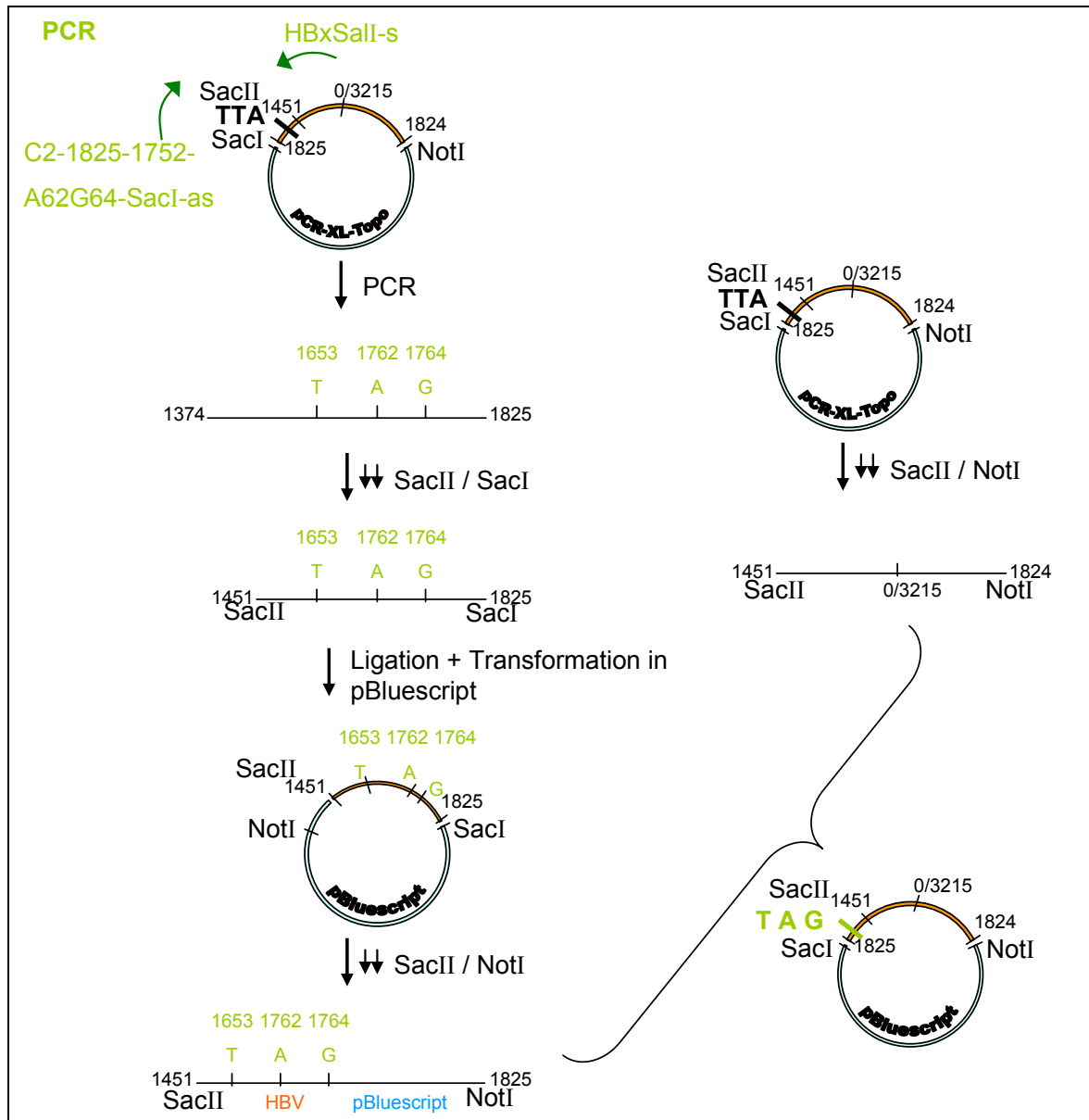


Abbildung 3-5: Klonierungsstrategie des C2TAG-Ganzgenoms in pBluescript. Ausgehend vom Plasmid pCR-XL-Topo-C2TTA wurde die PCR mit den aufgeführten Primern durchgeführt. Dargestellt sind die sich daran anschließenden Klonierungsschritte, hin zum fertigen Vektor pBluescript-C2TAG. Waagerechte Linien stellen den DNA-Doppelstrang dar. Senkrechte Pfeile geben Arbeitsschritte an. Senkrechte Doppelpfeile sind das Zeichen für einen Restriktionsverdau. *SacI*, *SacII* und *NotI* sind Restriktionsenzyme bzw. deren zugehörige Schnittstellen. Die Nummerierung verweist auf die entsprechende Position im HBV-Genom. Die Buchstabenkombinationen zeigen die klonierte Basenkombination an.

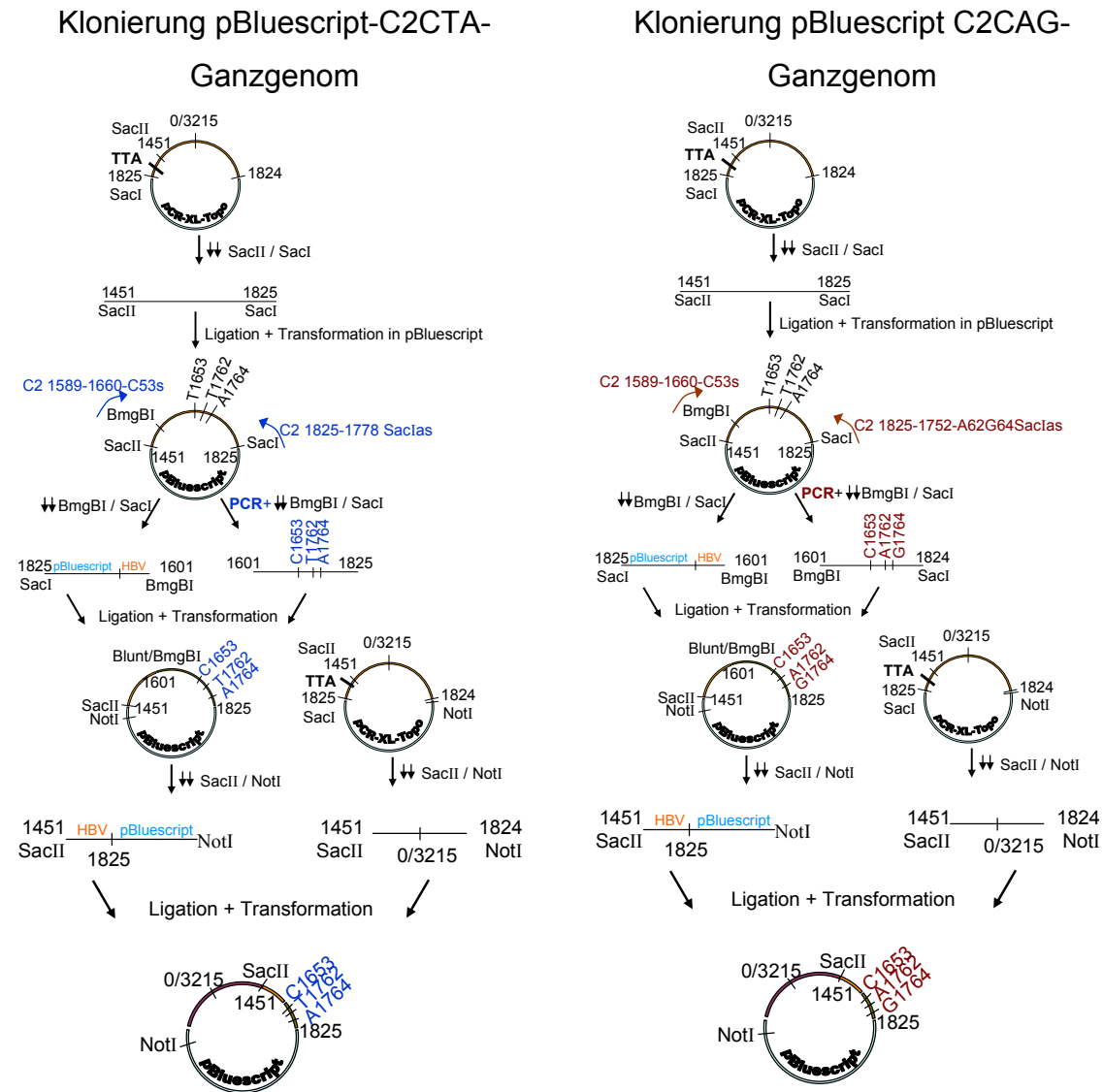


Abbildung 3-6: Klonierungsstrategie der C2CTA- und C2CAG-Ganzgenome in pBluescript.

Ausgehend vom Plasmid pCR-XL-Topo-C2TTA wurden die PCRs mit den aufgeführten Primern durchgeführt. Dargestellt sind die sich daran anschließenden Klonierungsschritte, hin zu den fertigen Vektoren pBluescript-C2CTA und pBluescript-C2CAG. Waagerechte Linien stellen den DNA-Doppelstrang dar, senkrechte Pfeile geben Arbeitsschritte an. Senkrechte Doppelpfeile sind das Zeichen für einen Restriktionsverdau. *SacI*, *SacII*, *BmgBI* und *NotI* sind Restriktionsenzyme bzw. deren entsprechende Schnittstellen. Die Nummerierung weist auf die entsprechende Position im HBV-Genom hin. Die Buchstabenkombinationen zeigen die klonierten Basenkombinationen an.

Aufbauend auf der von [105] entwickelten Methode wurde das aus dem Serum extrahierte und mittels PCR amplifizierte 3215 bp große HBV-Genom in den pCR-XL-Topo-Vektor kloniert. Dieses pCR-XL-Topo-C2TTA-Plasmid stellte die Grundlage aller folgenden Klonierungen dar. Die anderen drei Varianten wurden im Anschluss jeweils in den pBluescript-Vektor kloniert, da dieser über eine höhere

Anzahl von Restriktionsschnittstellen in der multiplen Klonierungsstelle (MKS) als der pCR-XL-Topo-Vektor verfügt, sodass weitere Klonierungen möglich wären. Die Klonierung von pBluescript-C2CAG wurde mit einem Doppelverdau des pCR-XL-Topo-C2TTA-Plasmids mit *SacI* und *SacII* gestartet, wodurch ein etwa 380 bp großes Fragment ausgeschnitten wurde. Zur Erzeugung eines Zwischenplasmides wurde dieses Fragment durch Ligation in den Vektor pBluescript eingefügt. Mit diesem Konstrukt wurden danach XL1-Blue-Zellen transformiert. Die auf LB-Agar-Platten gewachsenen Kolonien wurden mittels Mini-Plasmidpräparation aufgearbeitet. Die DNA wurde einer Kontrollrestriktion unterzogen und zur Erhöhung der DNA-Quantität mit Hilfe einer Maxi-Plasmidpräparation vermehrt und extrahiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Erzeugung der Punktmutation durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern. Für die Variante CAG wurden die Primer C2-1589-1660-C53s (welcher an Position 1653 des HBV-Genoms eine Mutation T1653C verursacht) und C2-1825-1752-A62G64*SacI*as (erzeugt die Mutationen T1762A und A1764G) verwendet. Im Anschluss wurden sowohl das PCR-Fragment als auch das Zwischenplasmid mit den Restriktionsenzymen *BmgBI* und *SacI* verdaut. Durch Ligation, Transformation und die oben bereits erwähnten weiteren Schritte wurde das zweite Zwischenplasmid erzeugt. Dieses wiederum wurde mit *SacII* und *NotI* verdaut um das verbleibende große Restfragment des HBV-Genoms (extrahiert aus dem Ursprungsvektor pCR-XL-Topo-C2TTA) aufnehmen zu können. Nach erneuter Ligation, Transformation und den anderen bereits erwähnten Klonierungs-Arbeitsabläufen wurden Glycerinkulturen der mit pBluescript-C2CAG transformierten XL1-Blue-Zellen bei -20 °C eingefroren. Auf diese Glycerinkulturen kann, wenn mehr Plasmid benötigt wird, jederzeit zurückgegriffen werden. Das Plasmid pBluescript-C2CAG wurde im Anschluss einer Kontrollsequenzierung unterzogen und die DNA-Konzentration bestimmt.

Das Plasmid pBluescript-C2CTA wurde mit Hilfe derselben Strategie hergestellt. Die dazu verwendeten Primer waren erneut C2-1589-1660-C53s (welcher an Position 1653 des HBV-Genoms eine Mutation T1653C verursacht) und diesmal C2-1825-1778*SacI*as.

Das Plasmid pBluescript-C2TAG konnte auf diesem Weg nicht hergestellt werden. Deshalb wurde hierfür eine neue Strategie entwickelt, welche in Abbildung 3-5 dargestellt ist. Eine PCR-Amplifikation des HBV-Genomabschnittes von Position

nt 1374 bis nt 1825 mit den Primern HBxSa/I-s und C2-1825-1752-A62G64SacIas stellte den ersten Schritt dar. Dieses PCR-Amplifikat wurde aufgereinigt, kontrollsequenziert und mit den Restriktionsenzymen SacI und SacII verdaut. Nach Ligation in pBluescript, Transformation und Aufarbeitung des Plasmides konnte so das erste Zwischenplasmid für die folgenden Klonierungsschritte hergestellt werden. Auch hier folgte wie bereits für die Klonierung von pBluescript-C2CAG bzw. -C2CTA beschrieben der SacII- und NotI-Restriktionsverdau mit der Ligation des aus dem pCR-XL-Topo-C2TTA-Plasmid ausgeschnittenen großen HBV-Restfragmentes. Am Ende der Arbeiten wurde das Plasmid pBluescript-C2TAG zur Kontrolle sequenziert. Tabelle 3-2 zeigt die hergestellten End-Konstrukte.

Tabelle 3-2: Hergestellte C2-Plasmide mit den jeweils vorhandenen Basenaustauschen.

Plasmid	Basenaustausch im HBV-Genom an Position		
	1653	1762	1764
pBluescript-C2CAG	C	A	G
pBluescript-C2CTA	C	T	A
pBluescript-C2TAG	T	A	G
pCR-XL-Topo-C2TTA	T	T	A

3.2.2. Herstellung der HBxWt-, HBxPolyLysin3xTGA- und der vier Subgenotyp C2HBx-Adenoviren

Die im Durchmesser rund 70 – 90 nm großen humanpathogenen Adenoviren gehören zur Familie der *Adenoviridae*. Sie gehören zu den unbehüllten Viren. Ihr ikosaedrisches Kapsid enthält die doppelsträngige lineare DNA. Adenoviren werden in der Gentechnik als virale Vektoren eingesetzt, um genetisches Material in Zielzellen zu schleusen. Der Transport der DNA in die Zielzelle wird als Transduktion bezeichnet. Mit der Transduktion erreicht man im Vergleich zur gängigeren Transfektion eine Aufnahme des genetischen Materials in nahezu 100 % der Zellen. Diese hohe Transduktionsrate kann durch in die Vektoren integrierten Reportergene wie GFP überprüft werden. Adenoviren integrieren nicht in das Genom der Zelle und werden auch nicht während der Zellteilung repliziert. All diese Eigenschaften werden genutzt, um eine nur vorübergehende Expression des Zielgens in der Zelle zu erreichen.

Für diese Arbeit wurden jeweils die Sequenzen der Hepatitis-B-Virus X-Proteine (HBx-Proteine) für Wildtyp (Wt), PolyLysin3xTGA, C2CAG, C2CTA, C2TAG und C2TTA in das Genom der Adenoviren kloniert.

Die Sequenz für das HBxWt ist ein anerkannter Wildtyp, welcher ursprünglich vom Labor von Prof. Schröder (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) charakterisiert wurde. Ebenfalls aus seinem Labor stammt das HBxPolyLysin. Es stellt eine natürlich vorkommende Variante des HBxWt dar [115]. Nachgewiesen wurde es, neben dem Wildtyp-X-Protein, in Patienten mit einem Hepatozellären Karzinom. Für die Herstellung von Adenoviren musste HBxPolyLysin modifiziert werden. Da es am 3'-Ende der Gensequenz eine *PacI*-Schnittstelle aufwies, wäre die Generierung von Adenoviren nicht möglich gewesen. Die *PacI*-Schnittstelle war Bestandteil einer Stoppkodon-Sequenz. Diese wurde mittels PCR-Amplifikation derart verändert, dass die ursprünglichen Stoppkodons durch drei TGA-Tripletts (ebenfalls Stoppkodons) ausgetauscht wurden (= HBxPolyLysin3xTGA).

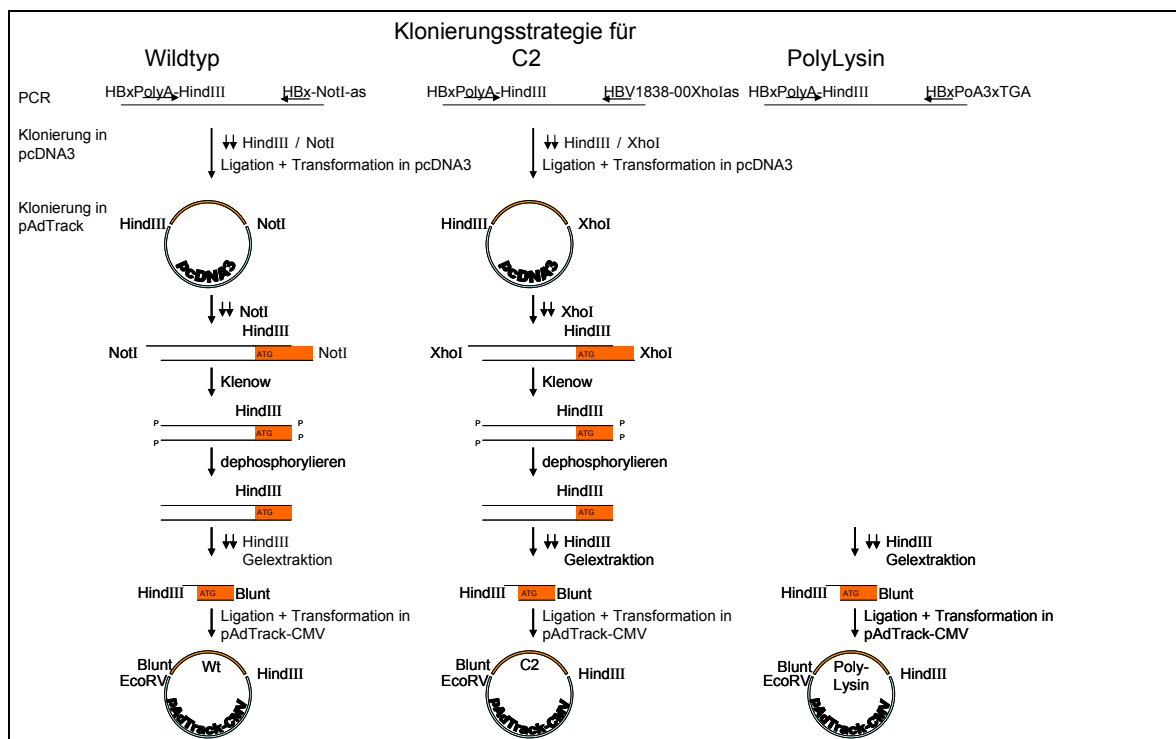


Abbildung 3-7: Drei Klonierungsstrategien zur Herstellung von pAdTrack-CMV-HBx-Vektoren. Pfeile: groß + senkrecht = Arbeitsschritte, klein + senkrecht = Restriktionsverdau, waagerecht = Bindungsstellen der PCR-Primer; „P“ = Phosphatreste; Wt, C2, PolyLysin = HBx-Genabschnitt; „ATG“ = Startkodon HBx-Gen; *HindIII*, *NotI*, *EcoRV*, *XhoI* = Restriktionsenzyme bzw. Restriktionsschnittstellen; Orange: HBx-Gene; blau: pcDNA3- bzw. pAdTrack-CMV-Vektor.

Abbildung 3-7 zeigt die drei entwickelten Strategien zur Klonierung der HBx-Proteine in den pAdTrack-CMV-Vektor. Allen gemein war die im Anschluss folgende homologe Rekombination, bis hin zur Gewinnung der Adenoviren (Abbildung 3-8).

Der erste Schritt aller drei Klonierungsstrategien bestand in einer sequenz-spezifischen PCR der HBx-Gene. Im Anschluss erfolgte die Klonierung der PCR-Produkte für HBxWt und der vier HBxC2 in den pcDNA3-Vektor. Danach erfolgte die Umklonierung in den pAdTrack-CMV-Vektor. Dazu wurde der jeweilige pcDNA3-HBx-Vektor mit dem Restriktionsenzym *NotI* (HBxWt) bzw. *XhoI* (HBxC2-Varianten) geöffnet. Mit Hilfe der 3'→5'-Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase I – Großes Klenow Fragment wurden die Überhänge entfernt und durch den Einsatz von Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) die Fragmentenden dephosphoryliert. Abschließend wurden die Fragmente mit *HindIII* verdaut, sodass die Ligation in den pAdTrack-CMV-Vektor über die *HindIII*-Schnittstelle und das glatte (*blunt*) Ende realisiert werden konnte. Nach der Aufarbeitung der Plasmide wurden diese zur Kontrolle sequenziert, bevor sie für die homologe Rekombination eingesetzt werden konnten.

Die Klonierung des HBxPolyLysin3xTGA erfolgte durch direkte Insertion des mit *HindIII* verdauten PCR-Fragmentes über die *HindIII*-Schnittstelle und das *blunt*-Ende in den pAdTrack-CMV-Vektor. Auch dieses Konstrukt wurde abschließend zur Kontrolle sequenziert.

Für die homologe Rekombination (Abbildung 3-8) wurden die pAdTrack-CMV-HBx-Plasmide mit *PmeI* verdaut und mittels Elektroporation in die pAdEasy-1-Plasmid enthaltenden BJ51383-Ad-1-Zellen eingeführt. Dort erfolgte die homologe Rekombination. Mit dem so entstandenen Fusionsplasmid wurden XL1-Blue kompetente Zellen transformiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Transfektion von Ad-293-Zellen zur Gewinnung der Viruslysate. Dazu wurde im Vorhinein das jeweilige Fusionsplasmid mit *PacI* verdaut. Im letzten Schritt erfolgte die Aufreinigung der Viren, deren Titer-Bestimmung und eine abschließende Kontroll-PCR. Die Transfektion der Ad-293-Zellen, sowie die Aufreinigung der Viren wurden von Frau BTA Stoll der Vektorologie und Experimentellen Gentherapie des Universitätsklinikum Rostock durchgeführt.

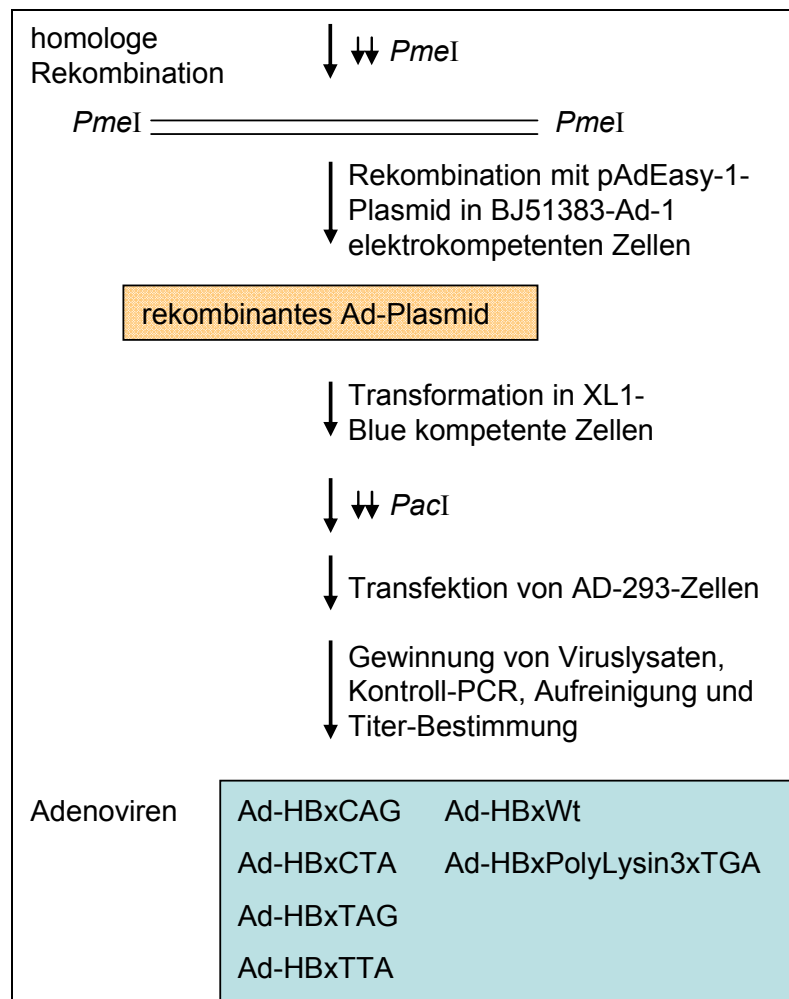


Abbildung 3-8: Darstellung des Ablaufs der homologen Rekombination hin zu den fertigen Adenoviren. Große senkrechte Pfeile verdeutlichen Arbeitsschritte. Kleine doppelte senkrechte Pfeile weisen auf einen Restriktionsverdau hin. *PmeI* und *PacI* sind Restriktionsenzyme bzw. deren entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Blau hinterlegt ist die Auflistung der erhaltenen Adenoviren.

Dank dieser entwickelten Strategien war es möglich die Adenoviren Ad-HBxWt, Ad-HBxPolyLysin3xTGA und die vier Ad-HBxC2 (Ad-HBxCAG, Ad-HBxCTA, Ad-HBxTAG, Ad-HBxTTA) als ein Ergebnis dieses Arbeitsabschnittes zu erhalten.

3.2.3. C2-Ganzgenomvarianten-Charakterisierung

Es stellte sich die Frage, ob die vorhandenen Varianten des C2-Konstruktes einen Einfluss auf die HBV-Infektion bzw. Replikation besitzen und wenn ja, ob dies ebenfalls in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden kann. Dazu wurden neben HepG2- noch HuH7-Zellen verwendet. Beide Zelllinien stammen aus differenzierten humanen Leberkarzinomen und wurden um 1980 erstmals beschrieben. Die HepG2-Zelllinie geht auf einen 15-jährigen ethnisch als

„kaukasisch“ bezeichneten Jungen zurück, die HuH7-Zelllinie auf einen 57-jährigen japanischen Mann. Zum Nachweis der HBV-Infektion bzw. Replikation in den Zellen wurden mittels ELISA HBsAg nachgewiesen bzw. das Nichtvorhandensein des HBeAg bestätigt. Dazu erfolgte die Transfektion von linearisierten HBV-Monomeren sowohl in 1×10^6 HepG2- als auch in HuH7Lunet-Zellen (Kapitel 2.2.6.3). Nach fünf Tagen erfolgte die Probennahme zur Bestimmung der HBsAg- und HBeAg-Werte mittels ELISA (Kapitel 2.2.3.2).

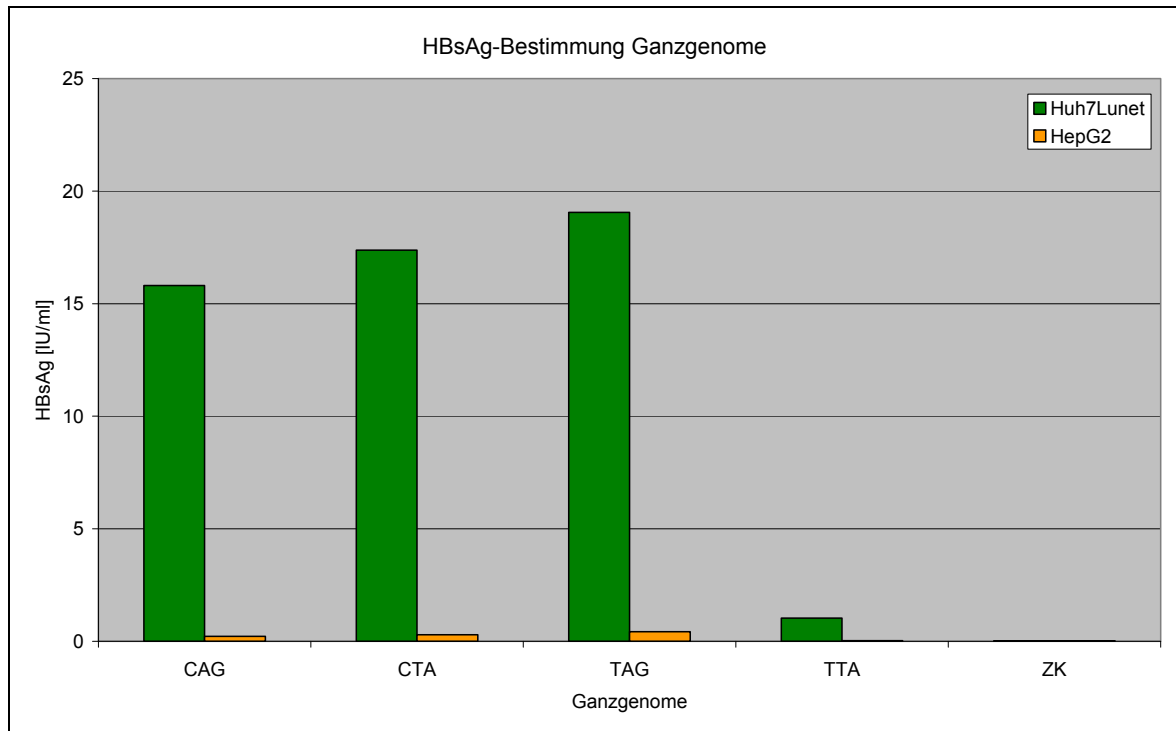


Abbildung 3-9: Quantifizierung von HBsAg der vier C2-Ganzgenome in HuH7- und HepG2-Zellen. Die Werte für HBsAg wurden in IU / ml aufgetragen. ZK = Zellkultur diente dabei jeweils als Negativkontrolle. n = 1.

Die gemessenen HBsAg-Werte der Proben in HepG2- und HuH7Lunet-Zellen unterscheiden sich sehr extrem in ihren Werten (Abbildung 3-9). Die Werte der HepG2-Proben liegen zwischen 0,03 (TTA) und 0,43 (TAG), wohingegen drei (CAG, CTA und TAG) von vier Proben in HuH7Lunet-Zellen mit ihren Werten zwischen 15,81 IU/ml (CAG) und 19,06 IU/ml (TAG) gemessen wurden. Mit einem Wert von 1,03 IU/ml ist TTA zwar sehr niedrig, aber dennoch als schwach reaktiv deklariert. Ebenso verhält es sich für die Werte von CAG, CTA und TAG, gewonnen aus HepG2-Zellen.

Die HBeAg-Werte sind, wie zu erwarten war, aufgrund der Mutation an nt 1896 alle nicht-reaktiv (ohne Abbildung).

Weiterhin sollte differenziell analysiert werden, ob die vier Konstrukte unterschiedliche Mengen neu synthetisierter verpackter HBV-DNA aufweisen. Dazu wurde die DNA aus freien Viruspartikeln des Zellkulturüberstandes extrahiert (Kapitel 0) und mittels PCR (Kapitel 2.2.1.15, Realtime-PCR) amplifiziert und gemessen. Abbildung 3-10 oben zeigt keinerlei Unterschiede in den DNA-Konzentrationen der verschiedenen Konstrukte.

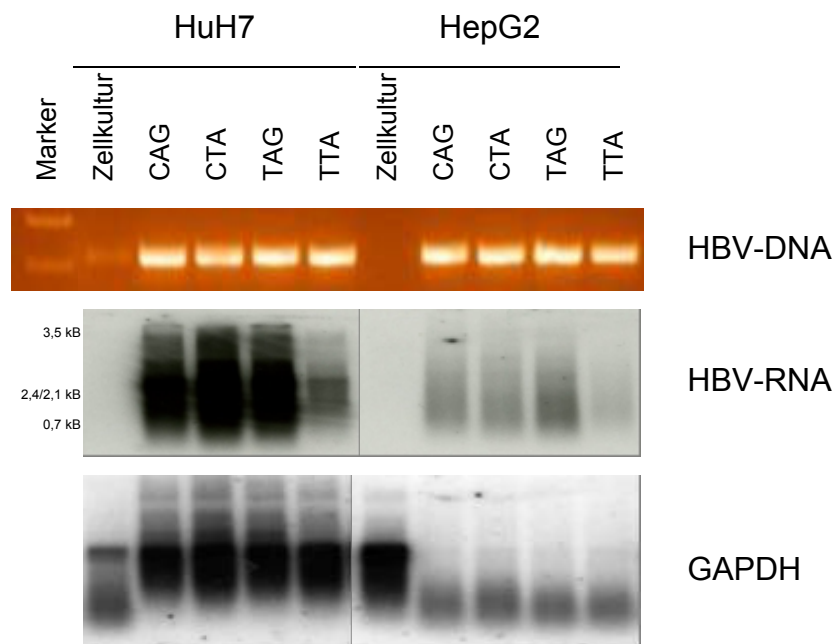


Abbildung 3-10: Vergleichende Analyse der DNA-Konzentrationen und RNA-Expressionen der vier C2-Ganzgenome in HuH7- und HepG2-Zellen. Oben der Gelauftrag von je 10 µl des PCR-Produktes auf ein 2%iges Agarosegel. Die aus den Zellkulturüberständen gewonnene DNA wurde in einer real-time-PCR amplifiziert. Die PCR erfolgte in 40 Zyklen. Es wurden die Primer ChIP-1565-1581-s und ChIP-as verwendet. Unten die Northern Blot-Ergebnisse und GAPDH als Ladekontrolle.

Zur Analyse viraler Transkripte wurden im nächsten Schritt Northern Blot-Analysen (Kapitel 2.2.2.3) durchgeführt.

Trotz der durch Degradation schlechten Qualität der extrahierten Gesamt-RNAs kann man sehr große quantitative Unterschiede sowohl zwischen den Zelllinien als auch den C2-Konstrukten feststellen (Abbildung 3-10 unten). Aus den HepG2-Zellen konnte nur eine relativ geringe Menge Gesamt-RNA extrahiert werden, wohingegen eine hohe Quantität aus den HuH7Lunet-Zellen isoliert werden konnte. Bezogen auf die HBV-RNA ist es daraufhin schwer, vergleichende Aussagen für die beiden Zellkulturen zu treffen (Abbildung 3-10, Mitte). Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl in den HepG2- als auch den HuH7Lunet-Zellen die

Konstrukte CAG, CTA und TAG eine vielfach höhere Expression der HBV-Gesamt-RNA aufweisen als TTA. Weiterhin bildet die Probe CTA in HuH7-Zelllinien mehr prägenomische RNA als CAG. Für die 2,4/2,1- und 0,7 kB RNAs können aufgrund der starken Banden keine Unterschiede quantifiziert werden.

3.2.4. Luciferaseassay zum Nachweis der mutmaßlichen TATA-Box

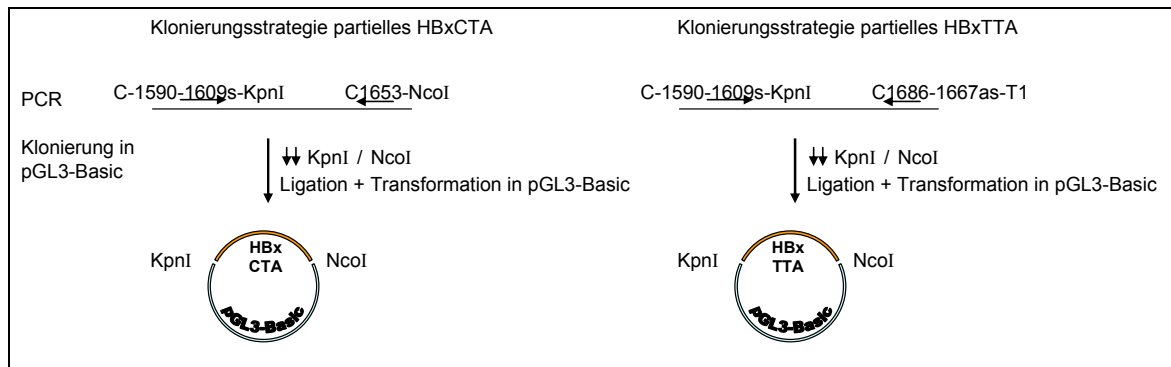


Abbildung 3-11: Strategien zur Klonierung partieller HBxCTA- und HBxTTA-Sequenzen.

Große senkrechte Pfeile verdeutlichen Arbeitsschritte. Kleine doppelte senkrechte Pfeile verweisen auf einen Restriktionsverdau. Waagerechte Pfeile zeigen die Bindungsstellen der PCR-Primer, welche namentlich darüber aufgeführt sind. „HBxCTA“ bzw. „HBxTTA“ = HBx-Genabschnitt. *KpnI*, und *NcoI* sind Restriktionsenzyme bzw. deren entsprechende Restriktionsschnittstellen. Orange hinterlegt sind die partiellen HBx-Genabschnitte, blau hervorgehoben der pGL3-Basic-Vektor.

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben entsteht durch den Basenaustausch an Position nt 1653 eine „TATA“-Sequenz. Zur Untersuchung dieser putativen TATA-Box wurden Luciferase-Assays durchgeführt.

Dazu wurde, ausgehend vom HBV-Genom des Patienten mit der Kombination TTA (T1653, T1762/A1764), mittels PCR eine Punktmutation an der Position nt 1653 vorgenommen, sodass die Kombination CTA (C1653, T1762/A1764) entstand (Abbildung 3-11). Es wurden Primer verwendet, die den partiellen Sequenzabschnitt (p) des HBV-Genoms von nt 1590 bis nt 1686 amplifizierten. Im Anschluss wurden diese Sequenzabschnitte über die *KpnI*- und *NcoI*-Restriktionsschnittstellen in den Luciferase Reporter Vektor pGL3-Basic kloniert. Dieser Vektor enthält ein Luciferase-Gen, welches durch direkte Kopplung mit dem hineinklonierten Element einen selektiven Indikator für Agonisten des natürlichen Aktivators darstellt. Durch diese Kopplung wird nach Aktivierung des Target-Gen-Promotors Luciferase hergestellt. Auf dieser Basis sind quantitative

Analysen der Promotor-Aktivität, mittels Messung der Aktivität der *Firefly*-Luciferase, möglich. 24 h vor Transfektion wurden 3×10^5 HepG2-Zellen pro Loch der 6-Lochplatten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde pro Loch je 1 µg pGL3-Basic-TTAp bzw. -CTAp mit TurboFect-Reagenz transfiziert (Kapitel 2.2.6.3) und wiederum 24 h später die Zellen lysiert. Mittels BCA-Proteinbestimmung (Kapitel 2.2.3.1) wurden die im Lysat befindlichen zytosolischen Proteine quantifiziert und auf dieser Grundlage im Luciferase-Assay dieselben Gesamt-Proteinmengen gemessen (Kapitel 2.2.6.4).

Grundsätzlich konnte mit Hilfe dieses Systems die Promotoraktivität für beide Konstrukte nachgewiesen werden. Entgegen aller Erwartungen konnte für TTA jedoch nur eine im Vergleich zu CTA verminderte Promotor-Aktivierung gemessen werden (Abbildung 3-12).

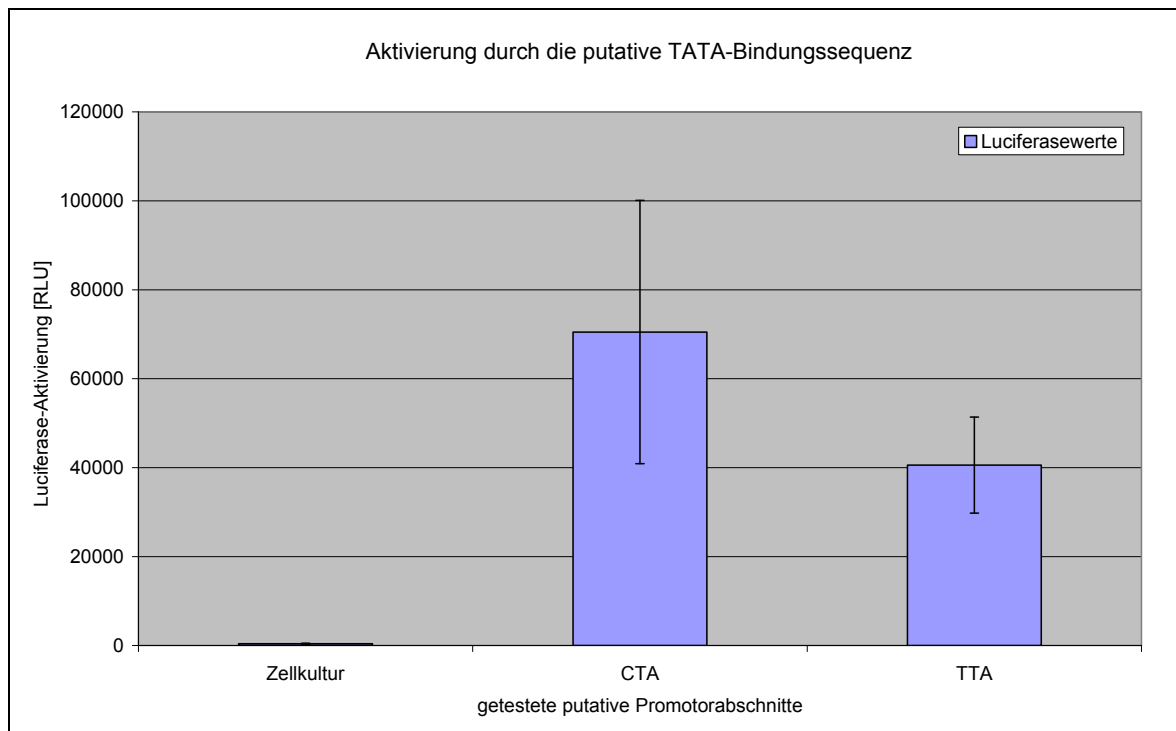


Abbildung 3-12: Luciferase-Reporterexperimente zur Analyse des Einflusses des C1653T-Austausches auf einen putativen Promotorbereich in HepG2-Zellen. Die Messung der Luciferase-Aktivität (*relative light units*, RLU) erfolgte 24 h nach Transfektion. Nicht transfizierte Zellen stellen die Negativkontrolle dar = Zellkultur. n = 3; Mittelwerte ± StA.

Um diese Daten zu belegen und die Versuchsbreite noch auf die Konstrukte CAG und CTA auszuweiten, sowie eine zweite Hepatomazelllinie HuH7Lunet mit einzubeziehen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Diese werden in den nächsten Kapiteln ausgewertet.

3.2.5. C1653-Einflüsse auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren

Hepatitis-B-Virus Enhancer II (Enh II) ist ein hepatotropes *cis*-Element, welches für die hepatozyten-spezifische Genexpression von HBV verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren mit dieser Region interagieren, so auch E4BP4, HLF und FTF. Untersuchungen zeigten, dass HLF und FTF einen stimulierenden Effekt auf die transkriptionelle Regulation besitzen, wohingegen E4BP4 eher einen supprimierenden Effekt verursacht. Ob der Austausch C1653 zu T1653 einen Einfluss auf die Bindungskapazität und infolge dessen auf die transkriptionelle Regulation besitzen, sollte mit Luciferase-Assays untersucht werden. Dazu wurden je 0,5 µg pGL3-Basic-CTAp- bzw. pGL3-Basic-TTAp-Plasmide sowie je 0,5 µg pFLAG-Ø, pFLAG-E4BP4, pFLAG-HLF bzw. pFLAG-FTF sowohl in 3 x 10⁵ HepG2- als auch in HuH7Lunet-Zellen kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte die Probennahme (siehe Methode Luciferase-Assays Kapitel 2.2.6.4) mit anschließender Konzentrationsbestimmung der aus dem Zelllysat gewonnenen Proteine und dem Luciferase-Assay.

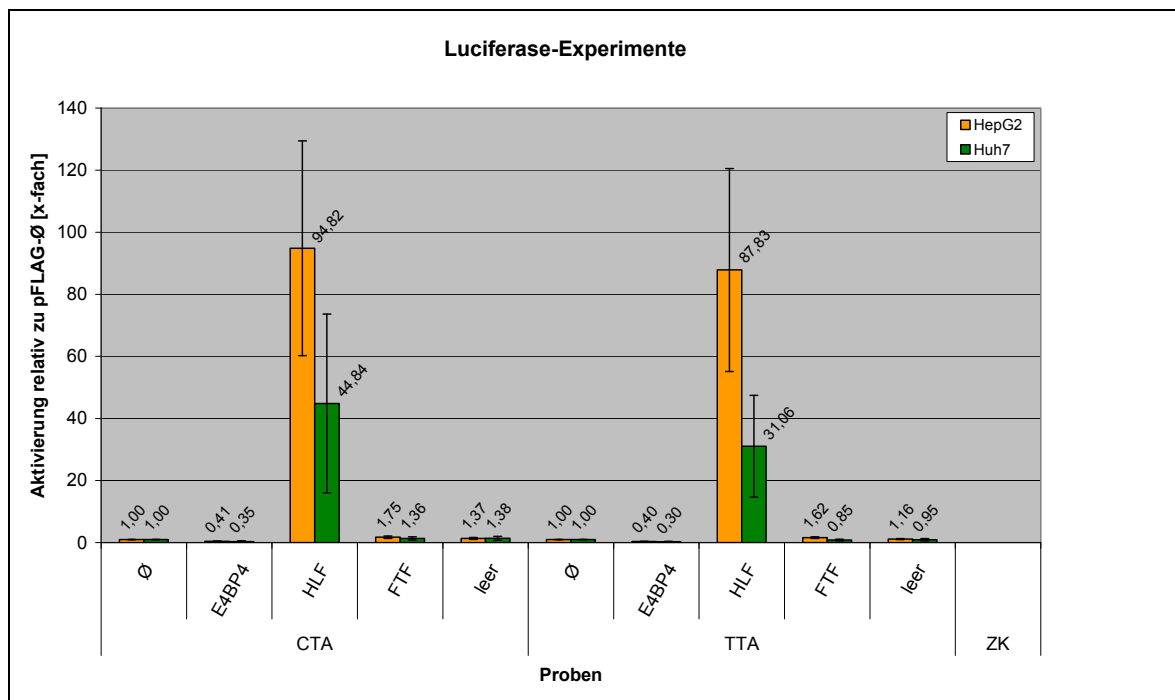


Abbildung 3-13: Nachweis unterschiedlicher transkriptioneller Regulation von CTA und TTA durch die drei Transkriptionsfaktoren. Dieser Versuch wurde sowohl in HuH7- als auch in HepG2-Zellen je 4x durchgeführt. Kotransfiziert wurden pGL3-Basic-CTAp- bzw. -TTAp und der jeweilige Transkriptionsfaktor im pFLAG-Vektor. Die Ergebnisse sind relativ zur Transfektion mit dem leeren Vektor pFLAG (Ø) dargestellt. Die Zellkultur (ZK) diente als Negativkontrolle. „leer“ = ohne Kotransfektion. n = 3; Mittelwerte ± StA.

Anhand dieses ersten Testes konnten verschiedene Sachverhalte studiert werden. Die Unterschiede zwischen den Zellkulturen sind sehr groß (Abbildung 3-13). Die Kombination von CTA mit dem Transkriptionsfaktor HLF aktiviert in HepG2-Zellen fast 95fach verglichen zum Wert ohne Transkriptionsfaktor und damit doppelt soviel wie in HuH7Lunet-Zellen (Wert 44,84). Bei der Kombination TTA und HLF findet eine fast dreifach so hohe Aktivierung in HepG2- (87,83) als in HuH7Lunet-Zellen (31,06) statt. Somit konnte ein stark stimulierender Effekt von HLF auf die transkriptionelle Regulation allgemein bestätigt werden, aber keiner hinsichtlich der Unterschiede zwischen CTA und TTA. Ebenso konnte für den Transkriptionsfaktor FTF in beiden Zelllinien ein stimulierender Effekt sowohl bei CTA als auch TTA gemessen werden. E4BP4 reprimiert im Gegensatz dazu sowohl in HepG2- als auch in HuH7Lunet-Zellen gleichermaßen.

3.2.5.1. Transfektionen mit Ganzgenomen

Im darauffolgenden Versuch sollte ermittelt werden, wie sich die transkriptionelle Regulation nach Kotransfektion linearisierter HBV-Monomere mit den drei Transkriptionsfaktoren verhält. Fünf Tage nach Transfektion erfolgte die Probenahme sowohl von HepG2- als auch HuH7Lunet-Transfektionsansätzen. Die Zellkulturüberstände wurden zur Bestimmung von HBsAg, HBeAg und DNA verwendet, die aus den Zellen aufgearbeitete RNA für Northern Blot-Analysen.

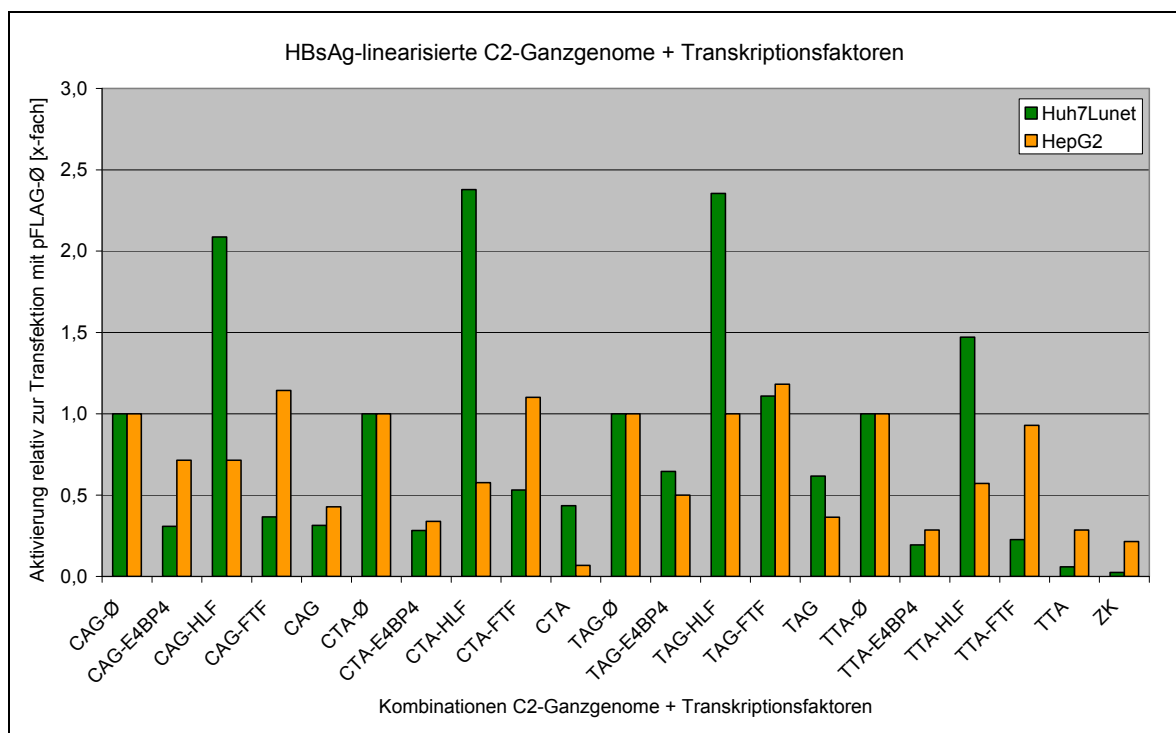


Abbildung 3-14: HBsAg-Analyse der kotransfizierten C2-Ganzgenom-Varianten CAG, CTA, TAG und TTA mit den Transkriptionsfaktoren in HepG2- und HuH7-Zellen. Die Analyse von HBsAg im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Verwendet wurden dazu die Zellkulturüberstände von je 1×10^6 mit 200 ng linearem HBV-Monomer und 0,5 µg Transkriptionsfaktor transfizierten HepG2- und HuH7-Zellen. Die Probennahme erfolgte nach fünf Tagen. Dargestellt sind die Aktivierungsfaktoren von unverdünnten Proben relativ zu den Kotransfektionen Variante mit pFLAG-Ø. ZK = Negativkontrolle, Material von untransfizierten Zellen. n = 1.

Prinzipiell sind alle auf HBsAg getesteten Proben in HuH7Lunet-Zellen reaktiv, ausgenommen die reine Zellkultur als Negativkontrolle (Abbildung 3-14). Die Proben CAG, CTA, Zellkultur sowie die Kombination TTA-E4BP4 sind hingegen in HepG2-Zellen HBsAg nicht-reaktiv. Alle weiteren Kombinationen sind nur schwach reaktiv, im Gegensatz zu den entsprechenden Untersuchungen in HuH7Lunet-Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). In Relation zum Aktivierungsfaktor der

Kotransfektionen Variante mit pFLAG-Ø, zeigen alle Kotransfektionen mit E4BP4 eine Reprimierung. Zellkulturspezifisch müssen die weiteren Ergebnisse betrachtet werden. Denn HLF aktiviert die HBsAg-Produktion in HuH7-Zellen um das 50-140fache, hingegen findet eine Reprimierung in HepG2-Zellen statt. Bis auf die Kotransfektion von TAG-pFLAG-FTF, bei der eine schwache Aktivierung zu verzeichnen ist, reprimiert FTF in HuH7-Zellen die HBsAg-Produktion um das mindestens 50fache. Hingegen zeigt FTF in HepG2-Zellen ausschließlich in Kombination mit TTA eine schwache Reprimierung. Es konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren einen direkten Einfluss auf die Partikelherstellung ausüben, da eine aktivierte oder reprimierte Produktion von HBsAg mit einer gesteigerten oder inhibierten Produktion von viralen Partikeln einhergeht. Jedoch spielt es keine Rolle, welche C2-Variante untersucht wurde. Die HBeAg-Werte aller Proben in beiden Zellkulturen wurden als nicht-reaktiv gemessen.

Weiterhin wurde die Virusreplikation durch quantitative Messung der sezernierten HBV-DNA bestimmt. In HuH7-Zellen kam es allein schon durch die Kotransfektion zu einer erhöhten Replikation bei CAG, CTA und TAG (Abbildung 3-15 A). Hingegen supprimierte die Kotransfektion in TTA-Ansätzen die Replikation. Im Vergleich der Kotransfektionen mit den Transkriptionsfaktoren verringerte sich die isolierbare DNA-Menge bei E4BP4- und erhöhte sich bei HLF- und FTF-Zugabe, wobei mehr DNA nach Kotransfektion mit HLF nachgewiesen werden konnte, als mit FTF. Mit Ausnahme der Kotransfektionen von CTA+HLF und TTA+Ø wurden in HepG2-Zellen geringere HBV-DNA-Mengen nachgewiesen als nach Monoinfektion (Abbildung 3-16 A). Kotransfektionen von CAG mit E4BP4 wiesen erhöhte DNA-Mengen auf, wohingegen HLF und FTF eine geringere Replikation zeigten. Kotransfektionen mit FTF zeigten dabei die geringste Replikationsrate. E4BP4, HLF und FTF, kotransfiziert mit CTA oder TTA, zeigten kaum messbare Unterschiede in der Replikation. Nach Kotransfektion von TAG und E4BP4 konnte im Vergleich zur Monoinfektion weniger DNA nachgewiesen werden, mit HLF und FTF mehr DNA. FTF hat dabei im Vergleich der drei Transkriptionsfaktoren am meisten DNA gebildet hat. Dieses letzte Ergebnis, steht im eindeutigen Kontrast zu den oben beschriebenen CAG-Kotransfektionen.

Die Northern Blots zum Nachweis der RNAs sind schlecht auswertbar, da die Proben wahrscheinlich degradiert waren (Abbildung 3-15 B oben und

Abbildung 3-16 B oben). Dies lässt sich anhand der nachweisbar geringen Menge des Haushaltsgens GAPDH festmachen (Abbildung 3-15 B unten und Abbildung 3-16 B unten). Dennoch ist es möglich auf den Northern Blots feine Unterschiede zwischen den Kotransfektionen auszumachen. So kann nach Kotransfektion aller Varianten mit HLF in HuH7-Zellen eine große Bande mit hoher Intensität im Vergleich zu den anderen Banden bzw. den anderen Kotransfektionen festgestellt werden (Abbildung 3-15 B oben). Diese Banden wiederum weisen unterschiedliche Intensitäten auf, welche mittels der Software „TINA“ bestimmt werden konnten. So weist die Probenkonstellation TAG+HLF die stärkste Bande auf. CAG+HLF und CTA hingegen produzieren eine um ein Viertel, TTA+HLF eine um ein Drittel geringere Bande (Ergebnisse numerisch nicht aufgezeigt). In HepG2-Zellen kann bei allen Proben diese große Bande gesehen werden (Abbildung 3-16 B oben). Ausgenommen davon sind die Kotransfektionen mit TTA, die diese Bande nicht so stark ausprägen scheinen wie die restlichen drei C2-Varianten. Exemplarisch wurden die Banden der CTA- bzw. TAG-Kombinationen gemessen. Diese weisen Unterschiede von bis zu 50 % auf (Ergebnisse numerisch nicht aufgezeigt).

Diese Beobachtungen sind jedoch nicht als signifikant einzustufen, da die Probenquantität zu gering war.

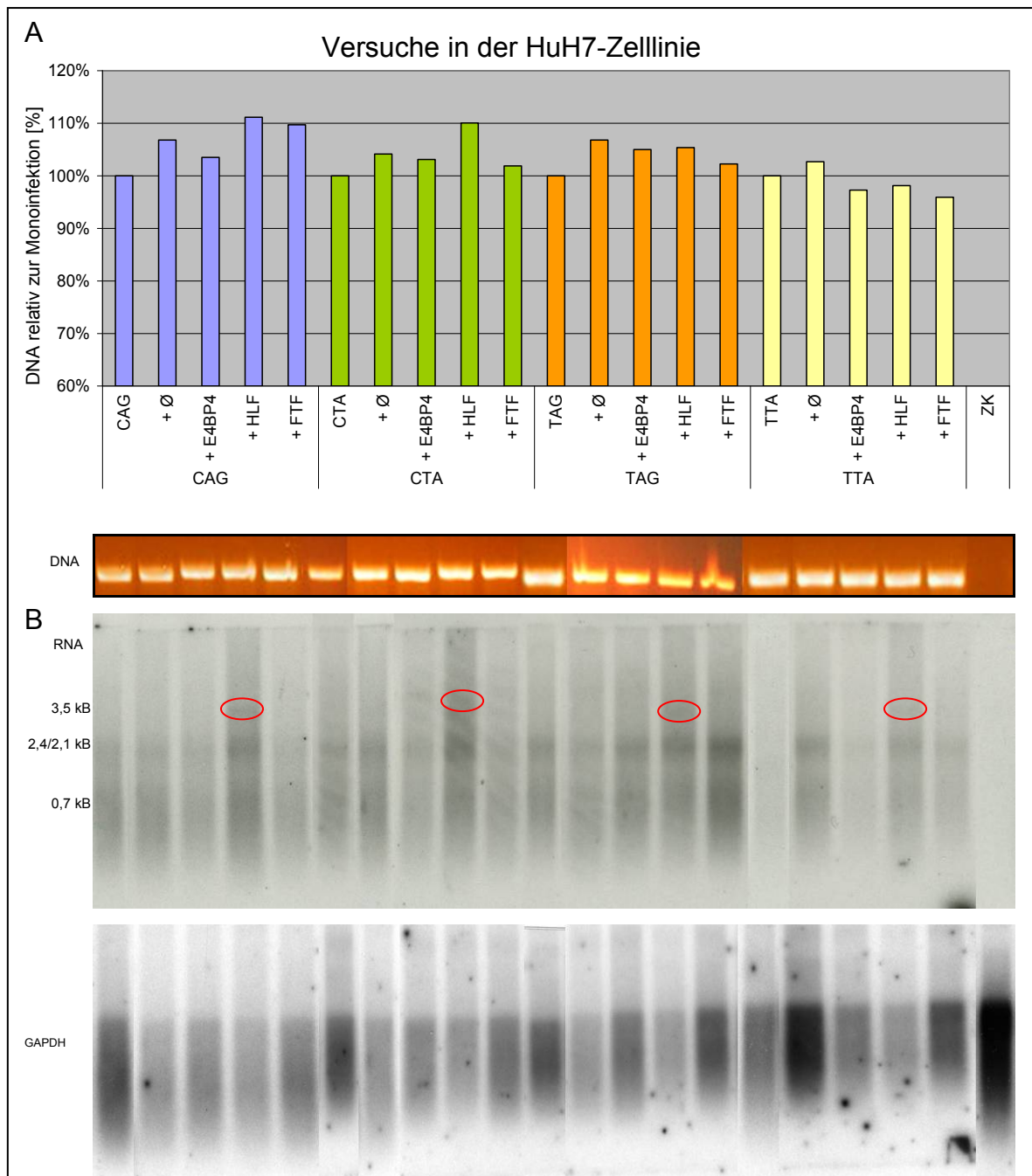


Abbildung 3-15: Phänotypische Analyse von Kotransfektionen der vier C2-Varianten CAG, CTA, TAG und TTA mit den Transkriptionsfaktoren E4BP4, HLF und FTF in HuH7-Zellen. Es wurden mit HBV-Gesamtgenom-DNA und Transkriptionsfaktoren transfizierte HuH7-Zellen eingesetzt. A: Die Replikations-Analyse erfolgte anhand der Quantifizierung der aus dem Zellkultur-überstand gewonnenen HBV-DNA mittels Realtime-PCR. Oben: Die gemessene DNA wurde relativ zur jeweiligen Monoinfektion dargestellt. Die Zellkultur diente als Negativkontrolle. Unten: Auftrag der DNA im Agarosegel. n = 1. B: Analyse der Transkription. Oben: Northern Blots von Gesamt-RNA wurden mit einer HBV-Gesamtgenomsonde hybridisiert. Als HBV-Marker diente das 1:1.000 verdünnte Produkt einer PCR von HBV-Gesamtgenom mit einem 3,2 kB-Doppelstrang-Fragment. Die Intensität der rot umrandeten Banden wurde mit dem TINA-Programm bestimmt. Unten: Als Ladekontrolle wurde GAPDH-RNA mit einer Sonde auf dem Blot detektiert.

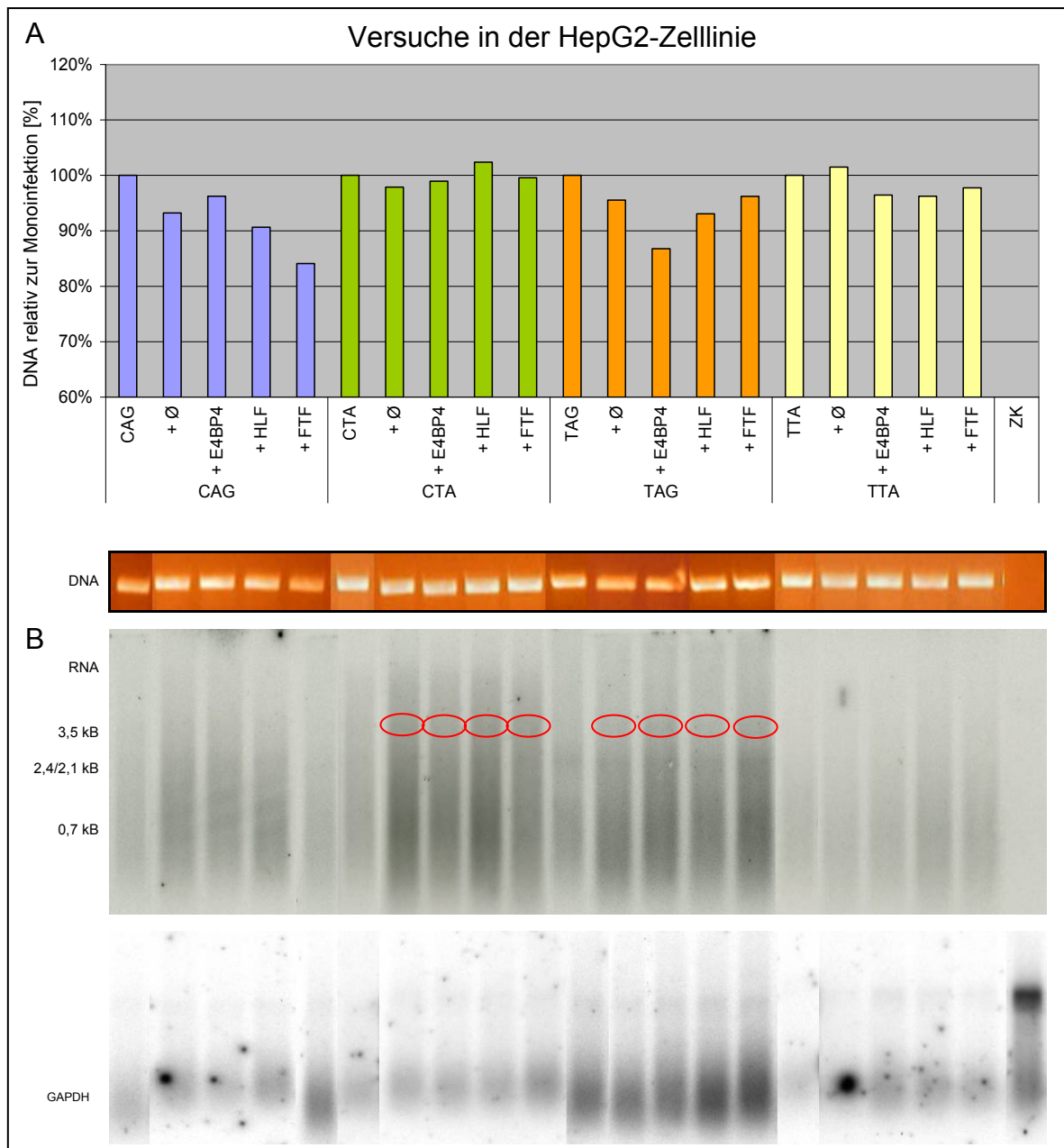


Abbildung 3-16: Phänotypische Analyse von Kotransfektionen der vier C2 Varianten CAG, CTA, TAG und TTA mit den Transkriptionsfaktoren E4BP4, HLF und FTF in HepG2-Zellen. Es wurden mit HBV-Gesamtgenom-DNA und Transkriptionsfaktoren transfizierte HepG2-Zellen eingesetzt. A: Die Replikations-Analyse erfolgte anhand der Quantifizierung der aus dem Zellkultur-überstand gewonnenen HBV-DNA mittels Realtime-PCR. Oben: Die gemessene DNA wurde relativ zur jeweiligen Monoinfektion dargestellt. Die Zellkultur diente als Negativkontrolle. Unten: Auftrag der DNA im Agarosegel. n = 1. B: Analyse der Transkription. Oben: Northern Blots von Gesamt-RNA wurden mit einer HBV-Gesamtgenomsonde hybridisiert. Als HBV-Marker diente das 1:1000 verdünnte Produkt einer PCR vom HBV-Gesamtgenom mit einem 3,2-kB-Doppelstrang-Fragment. Die Intensität der rot umrandeten Banden wurde mit dem TINA-Programm bestimmt. Unten: Als Ladekontrolle wurde GAPDH-RNA mit einer Sonde auf dem Blot detektiert.

3.2.6. *In vivo* Nachweis der TBP-Bindung mittels ChIP

Die Methode der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) hilft beim Auffinden von Protein-DNA-Interaktionen *in vivo*, unter Berücksichtigung des gesamten HBV-Genoms. Solche Protein-DNA-Interaktionen sollten im nächsten Schritt gesucht werden. Den Ausgangspunkt dieser Untersuchungen stellt die Tatsache dar, dass an die putative „TATA“-Sequenz auch TATA-bindende Proteine (TBPs) binden sollten und diese mit Hilfe der ChIP-Methode nachgewiesen werden können. Dazu wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 14,5 cm je 5×10^6 HuH7Lunet-Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden je 1 µg linearisierte HBV-Monomere von CAG, CTA, TAG und TTA mit je 1 µg eGFP-Plasmid mit Hilfe von TurboFect-Reagenz kotransfiziert. Nach 48 h konnte bei allen Proben die gleiche Menge an grünfluoreszierenden Protein visuell beobachtet und die Proben nach dem Protokoll von Nelson *et al.* (Kapitel 2.2.3.3) aufgearbeitet werden [110]. Nach dem *cross-linking* der DNA-gebundenen Proteine mit Formaldehyd sowie anschließender Sonifizierung, wurden die endogenen TBP-DNA-Komplexe im HuH7Lunet-Zelllysat mit einem monoklonalen [1TBP18] Maus-Antikörper immunpräzipitiert und durch PCR mittels spezifischer Primer zum Nachweis der unterschiedlichen Bindungsaffinität der putativen Promotor-Sequenz analysiert. Es wurde eine Realtime-PCR (Kapitel 2.2.1.15, Realtime-PCR) mit den Primern ChIP-1565-1581-s und ChIP-1784-1765-as durchgeführt, welche den Genabschnitt zwischen nt 1565 und nt 1784 amplifizierten.

Tabelle 3-3: Einfluss der Varianten C1653T und A1762T/G1764A auf die Bindung von TBP an die basale Core-Promotor (BCP)-Region. ChIP von HBV exprimierenden HuH7Lunet-Zellen 48 h nach Transfektion mit linearisierten HBV-Genomen von CAG, CTA, TAG und TTA. Die TBP-DNA-Komplexe wurden mit dem [1TBP18]-Maus-Antikörper immunpräzipitiert. Vor Zugabe des Antikörpers wurde von jeder Probe Input-DNA entnommen. Die präzipitierte DNA wurde mittels Realtime-PCR amplifiziert. Angegeben sind die C(t)-Werte (beschreiben den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt) der Input- bzw. ChIP-DNA der vier Varianten.

		C(t)-Werte
Input	CAG	12,9
	CTA	13,9
	TAG	11,7
	TTA	13,3
ChIP	CAG	20,1
	CTA	20,4
	TAG	17,0
	TTA	20,6

Aufbauend auf den Unterschied der C(t)-Werte zwischen den einzelnen Varianten, welcher sich aus der unterschiedlichen Bindungsrate von TBP an die HBV-DNA ergibt, konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden. Die Bindungsrate von TBP an die DNA unterscheidet sich bei den Varianten kaum (Tabelle 3-3 und Abbildung 3-17). Die Variante TAG scheint anhand der ChIP-PCR-Daten zwar eine erhöhte Bindungsaffinität zu haben, da aber bereits in der Input-PCR mehr DNA vorzufinden ist, hebt sich dieser Effekt wieder auf und es ist kein Unterschied zu den anderen Varianten zu erkennen.

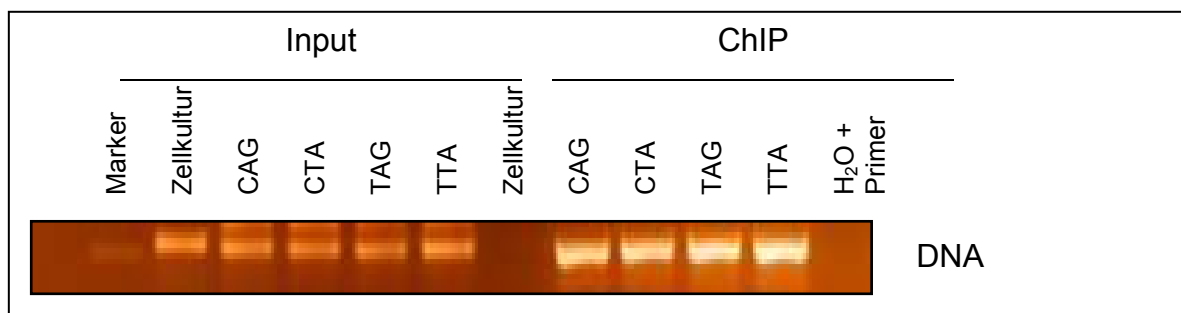


Abbildung 3-17: Vergleich Input- zu ChIP-DNA der beiden PCRs. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der PCR-Ansätze auf einem 2%igen Agarosegel. Die PCR amplifizierte DNA-Fragmente mit einer Größe von 219 bp. Gene Ruler 100 bp DNA-Leiter ist der verwendete Marker. Neben den vier Varianten wurde die Zellkultur als Experiment-Negativkontrolle und H₂O+Primer als PCR-Negativkontrolle mitgeführt.

In der als Negativkontrolle mitgeführten Zellkultur konnte mittels der Input-PCR DNA amplifiziert werden. Dies ist wahrscheinlich auf unspezifische Primer-amplifikation zurückzuführen. Dies geschieht dann, wenn die Zyklenzahl der PCR sehr hoch (hier 35 Zyklen) und die Annealingtemperatur sehr niedrig (hier 51 °C) ist, sowie wenn sich im Nachhinein herausstellt, dass die Menge an eingesetztem Probenmaterial im Vergleich zum PCR-Ansatzvolumen sehr hoch ist. Die Unspezifität lässt sich anhand der Schmelzkurve belegen, welche für die Zellkultur-Probe von denen der anderen Proben abweicht und zusätzlich nicht den spezifischen Peak aufweist. Die PCR-Parameter wurden jedoch so belassen, damit verschiedene PCRs parallel laufen konnten, sodass die Ergebnisse direkt miteinander vergleichbar waren. Alle übrigen PCR-Produkte entsprachen den zu erwartenden Größen von 219 bp.

3.2.7. Auffinden und Kartierung verschiedener HBx-mRNAs

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) ist eine PCR-basierte Methode, welche das Klonieren von Vollängen cDNAs erleichtert, wenn nur eine partielle cDNA-Sequenz verfügbar ist. Ziel war es, mittels dieser Methode festzustellen, ob verschieden große Hepatitis-B-Virus X-mRNAs existieren, welche sich hinsichtlich ihrer 5'-Enden, aber nicht ihrer 3'-Enden, unterscheiden. Die RACE-Untersuchungen wurden unter zwei verschiedenen Herangehensweisen gestartet. Zum einen wurden die Adenoviren mit den C2HBx-Konstrukten eingesetzt, zum Anderen die linearisierten C2-Ganzgenome. Untersucht werden sollte, welche Hepatitis-B-Virus X-mRNAs gebildet werden und ob es Unterschiede zwischen der adenoviralen und der Ganzgenom-Expression gibt. Der Anwendung der RACE-Methode vorangehend, wurden HepG2-Zellen eingesät. Für den Adenoviren-Versuch wurden je 5×10^5 HepG2-Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen eingesät. 24 h später wurden die Zellen mit den Adenoviren HBxCAG, HBxCTA, HBxTAG und HBxTTA transduziert (MOI 60 für HepG2-Zellen) und nach 12 h die RNA (Probennahme siehe Microarray-Analyse Kapitel 2.2.2.4) extrahiert. Die Ganzgenom-Experimente wurden in 10 cm-Zellkulturschalen mit 1×10^6 Zellen durchgeführt, wobei 24 h nach Einsäen der HepG2-Zellen je 3 µg linearisierte HBV-Monomere mit TurboFect-Transfektionsreagenz transfiziert wurden (Kapitel 2.2.6.3). 72 h nach Transduktion erfolgte die Probennahme zur RNA-Gewinnung (Kapitel 2.2.2.2). Die RACE-Methode wurde sowohl für den Adenoviren- als auch den Gesamtgenom-Versuch wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt. Mittels 5'-RACE spezifischen Primern und 3'-HBx spezifischen Primern wurden nested-PCRs durchgeführt (Kapitel 2.2.1.15, RACE-PCR). Nach Gelauftrag der PCR-Produkte wurden die Banden extrahiert, mittels TOPO TA-Klonierungskit in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert (Kapitel 2.2.1.10) und sequenziert.

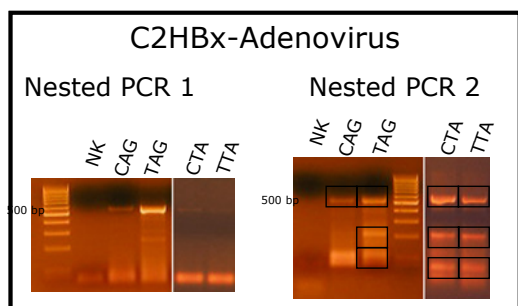


Abbildung 3-18: PCR-Ergebnis nach RACE der adenoviralen HBxC2-Konstrukte. Im Anschluß an die Aufarbeitung mittels RACE wurden zwei nested-PCRs durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der aufgearbeiteten Proben in die nested-PCR 1 eingesetzt. Für die nested-PCR 2 wiederum 10 µl der ersten PCR eingesetzt. Auf ein 2%iges Agarosegel wurden danach je 10 µl der Proben aufgetragen. Die Banden mit den schwarzen Rechtecken wurden sequenziert. Die PCR-Ansätze ohne Proben stellten die Negativkontrolle = NK dar.

Tabelle 3-4: Sequenzierungsergebnisse nach RACE auf Basis der vier Adenoviren-Konstrukte der HBxC2-Varianten. Nach Gelextraktion der hervorgehobenen Banden und erfolgter Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor, wurden die Banden sequenziert. Ziel der Sequenzierung war es die Startpunkte der verschiedenen HBx-mRNAs zu kartieren. Die angegebenen Werte repräsentieren die ermittelten Startnukleotide innerhalb der HBV-Genomsequenz. Das kleinste PCR-Amplifikat der Probe CAG wurde nicht sequenziert = n. s.

C2HBx-Adenovirus RNA-Startnukleotid			
CAG	CTA	TAG	TTA
1374	1374	1374	1374
	1627	1627	1627
n.s.	1762	1741	1771

Die nested-PCR für die Adenoviren-Konstrukte amplifizierte bei allen vier Proben eine circa 500 bp große Bande (Abbildung 3-18). Circa 200 bp große Amplifikate wurden ausschließlich bei CTA, TAG und TTA, aber nicht bei CAG nachgewiesen. CAG und TAG wiederum besitzen jeweils ein Amplifikat, welches eine scheinbare Größe von über 100 bp hat, wohingegen CTA und TTA eine etwas kleinere Bande amplifizierten. Nach erfolgter Klonierung und anschließender Sequenzierung konnten die ermittelten putativen Startpunkte der HBx-mRNAs verglichen werden (Tabelle 3-4). Die größten Banden weisen alle einen Start der mRNAs an Position nt 1374 im HBV-Genom auf. Dies geht einher mit der Tatsache, dass der CMV-Promotor der Adenoviren vorgeschaltet war. Daran schließt sich der Start der mRNA des HBV-Anteils an. Die ersten Basen, welche in den Adenoviren vorhanden sind, stellen den Start des HBx-Gens dar. Die mittelgroßen Banden beginnen alle drei an Position nt 1627 des HBV-Genoms. Die kleinen Banden zeigen unterschiedliche Startpunkte: TAG bei nt 1741, CTA bei nt 1762 und TTA bei nt 1771. Bei CAG ist ebenfalls eine kleine Bande vorhanden, bei der angenommen wurde, dass sie auf derselben Höhe läuft, wie die von TAG und deshalb weder kloniert noch sequenziert worden ist.

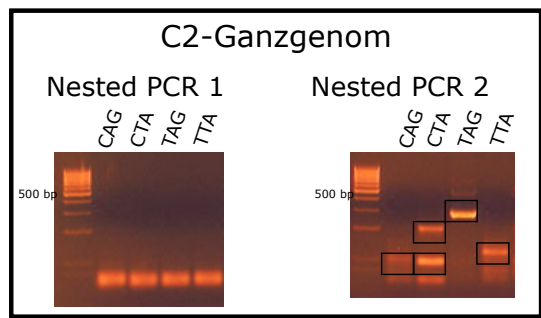


Abbildung 3-19: PCR-Ergebnis nach RACE der transfizierten linearisierten **C2-Ganzgenom-Proben**. Dabei weisen die Proben CAG, CTA und TAG unterschiedlich große DNA-Amplifikate auf. Die Banden mit den schwarzen Rechtecken wurden im Anschluss kloniert und sequenziert. Zusätzlich zu den Proben wurde der GeneRuler 100 bp-Leiter aufgetragen.

Tabelle 3-5: Sequenzierergebnis der nach RACE erhaltenen DNA-Amplifikate der C2-Ganzgenom-Proben. Die Startpunkte der mRNAs wurden dabei auf die angegebenen Nukleotide des HBV-Genoms kartiert. Da das größte Amplifikat von TAG zu schwach ausgeprägt war, konnte es nicht sequenziert werden (n.s. = nicht sequenziert).

C2-Ganzgenom RNA-Startnukleotid			
CAG	CTA	TAG	TTA
		n.s.	
		1547	
	1628		
1741	1741		1742

Im Gegensatz zu den Adenoviren weisen die Ganzgenom-PCRs nur bei TAG ein sehr schwaches Amplifikat auf Höhe von 500 bp auf (Abbildung 3-19). Dieses war jedoch zu schwach zum Extrahieren und Klonieren. Um vielleicht dennoch vorhandene Banden dieser Größe zu erhalten, wurde die Elongationszeit der PCR verlängert. Aber auch das brachte keine zusätzlichen Amplifikate dieser Größe. Weiterhin weist nur TAG allein eine Bande knapp unter 300 bp auf, womit die einzigen zwei Banden von TAG beschrieben sind. Für dieses zweite Amplifikat konnte nach Sequenzierung ein Startpunkt bei nt 1547 ermittelt werden (Tabelle 3-5). Die nächst kleinere Bande liegt bei einer Größe von knapp unter 200 bp, besitzt einen Start an Position nt 1628 des HBV-Genoms und ist nur bei CTA vorhanden. Die kleinsten Banden von CAG, CTA und TTA liegen ungefähr bei 100 bp, wobei die Bande von TTA etwas größer zu sein scheint. Dies konnte durch die Sequenzierung nicht bestätigt werden, da alle drei Konstrukte einen Start bei nt 1741 bzw. nt 1742 aufweisen und somit gleich groß sind.

Um Unterschiede in der Expression der verschiedenen mRNAs zu quantifizieren, wurden die PCR-Banden im Vergleich zum Agarosegel-Hintergrund vermessen.

Tabelle 3-6: Vergleich der Signalintensitäten der Banden aus dem Adenoviren-Versuch. Die Signalintensitäten der DNA-Banden, dargestellt als (optische Dichte – Hintergrund)/mm², wurden mit dem Programm „TINA 2.0“ bestimmt. n.s. = nicht sequenziert.

C2HBx-Adenovirus - Bandensignalintensitäten							
CAG		CTA		TAG		TTA	
RNA-Start	Intensität	RNA-Start	Intensität	RNA-Start	Intensität	RNA-Start	Intensität
1374	0,1	1374	1,2	1374	0,5	1374	0,8
		1627	0,9	1627	0,7	1627	0,8
n.s.	1,0	1762	0,6	1741	0,7	1771	0,7

Tabelle 3-7: Vergleich der Signalintensitäten der Banden aus dem Ganzgenom-Versuch. Die Signalintensitäten der DNA-Banden, dargestellt als (optische Dichte – Hintergrund)/mm², wurden mit dem Programm „TINA 2.0“ bestimmt. n.s. = nicht sequenziert.

C2-Ganzgenom - Bandensignalintensitäten							
CAG		CTA		TAG		TTA	
RNA-Start	Intensität	RNA-Start	Intensität	RNA-Start	Intensität	RNA-Start	Intensität
				n.s.			
				1547	1,4		
		1628	0,8				
1741	0,5	1741	1,3			1742	1,0

Die mittels der TINA-Software gemessene Bandenintensität stellt sich als sehr unterschiedlich dar. Die Software errechnet die Differenz aus der Lichtintensität der Banden und dem natürlichen Hintergrundrauschen des Gelbildes. Die Banden mit derselben Größe vergleichend betrachtet, wurde bei den Adenoviren mit mRNA-Start an Position nt 1374 mit Abstand die größte Bandenintensität bei CTA mit einem Wert von 1,2 festgestellt (Tabelle 3-6). Die Banden von TTA (0,8) und TAG (0,5) sind weniger stark. Erstaunlicherweise wird die Volllängen-HBx-mRNA beim HBxWt CAG mit einem Wert von 0,1 am geringsten exprimiert. Die Banden mit dem Startpunkt nt 1627 weisen alle eine ähnliche Intensität (0,8 im Mittel) auf. Die kleinsten Banden liegen in einem ähnlichen Intensitätsbereich, ausgenommen der Probe von CAG, welche eine Intensität von 1,0 aufweist.

Bei den Ganzgenom-Untersuchungen (Tabelle 3-7) war es nicht möglich einen Wert für die größte Bande von TAG zu bestimmen, da diese sich zu wenig vom Hintergrundrauschen abhob. Die weiteren Banden weisen sehr unterschiedliche Intensitäten auf, wobei die zweitgrößte Bande von TAG (1,4) und die kleinste Bande von CTA (1,3) annähernd dieselben Werte besitzen. Bei dem Vergleich der kleinsten Banden sind sehr große Intensitätsunterschiede zu erkennen (CTA = 1,3; TTA = 1,0; CAG = 0,5). Die einzige Bande mit einem Startpunkt bei nt 1628 konnte bei CTA mit einem Wert von 0,8 ermittelt werden.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden die RACE-Experimente ausgeweitet. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob diese Hepatitis-B-Virus X-mRNAs auch in klinischen Proben so auftreten. Dazu wurden Leberbiopsie-Proben von 20 Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom (HCC) verwendet. Aus diesen wurde im ersten Schritt DNA extrahiert, welche im Bereich zwischen nt 1604 bis nt 2000 des HBV-Genoms sequenziert wurden, um so nach den Varianten an Position nt 1653 und nt 1762/64 zu suchen. Sechs Proben wurden erfolgreich sequenziert. Keine der Sequenzen wies den Wildtyp C1653 auf. Somit waren alle Proben die Variante T1653. Von diesen 6 Proben wiesen 2 Proben den Wildtyp A1762/G1764 auf, 4 Proben die Variante T1762/A1764. Im Anschluss erfolgte die RNA-Extraktion dieser 6 Leberbiopsie-Proben (Kapitel 2.2.2.1), deren Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.2.1.14) und die RACE-Aufarbeitung (Kapitel 2.2.2.5) inklusive der zwei RACE-PCRs (Kapitel 2.2.1.15, RACE-PCR). Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel getrennt und die Banden extrahiert. Jede Leberbiopsie-Probe lieferte nur eine auswertbare PCR-Bande. Die Klonierung dieser DNA-Fragmente wurde von einem kommerziellen Unternehmen übernommen, ebenso wie die sich anschließende Sequenzierung. Abschließend wurden die Sequenzergebnisse ausgewertet.

Tabelle 3-8 listet die ermittelten mRNA-Starts der verschiedenen Klone der Leberbiopsien vergleichend zwischen den Proben CAG und CTA für die einzelnen Klone auf. Durch das Unternehmen konnten nur 5 von 6 Proben kloniert und sequenziert werden. Aus diesen Proben wird ersichtlich, dass bei CAG die ermittelten mRNA-Starts fast alle im Bereich von nt 1760 liegen. Hingegen konnten mRNA-Starts bei CTA an den Positionen nt 1276, nt 1766 und nt 1770 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mit Hilfe der RACE-Methode sowohl große als auch kleinere HBX-mRNAs kartiert werden konnten. Basengenaue HBX-mRNA-Starts konnten nicht festgelegt werden, jedoch Bereiche für den „großen“ HBX-mRNA-Start vor nt 1374, den „mittleren“ HBX-mRNA-Start um nt 1547, dem „kleinen“ HBx-mRNA-Start um nt 1627 und einem „mini“ HBX-mRNA-Start zwischen nt 1741-1771. Unterschiede zwischen den einzelnen Konstellationen (CAG, CTA, TAG und TTA) konnten nicht reproduzierbar aufgezeigt werden.

Tabelle 3-8: Auflistung der ermittelten mRNA-Starts der Leberbiopsie-Proben. Untersucht wurden verschiedene Proben mit den Basenkombinationen CAG bzw. CTA. Die PCR-Produkte wurden kloniert und im Anschluss unterschiedliche Klone sequenziert. Die Sequenzauswertung ergab die angegebenen mRNA-Starts.

Leberbiopsie-Proben								
	Probennr.	Klon	RNA-Start			Probennr.	Klon	RNA-Start
CAG	27	1	1761	CTA	7	1	1276	
		2	1758			2	1766	
		4	1761			4	1766	
		5	1758			5	1766	
		6	1759			6	1766	
	60	3	1755		52	1	1770	
		4	1760			2	1770	
		5	1760			4	1770	

3.2.8. Bestimmung der Genexpressionsprofile von HepG2-Zellen hervorgerufen durch HBV X-Protein-Varianten

Die nächste Frage war, wie sich die Expression von HBx-Varianten auf die zellulären Genexpressions-Muster auswirkt. Ein Ansatz ist es, dazu die Microarray-Technologie zu verwenden, welche eine gleichzeitige Analyse der Expressionsprofile von tausenden von Genen ermöglicht. Zur Bestimmung der differenziellen Genexpression wurden die vier HBxC2-Varianten CAG, CTA, TAG und TTA sowie das COOH-terminal verkürzte HBxPolyLysin herangezogen. Dazu wurden 1×10^6 HepG2-Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen 24 h vor Transduktion ausgesät. Die Zellen wurden mit den fünf HBx-Adenoviren transduziert (Kapitel 2.2.7.1). Die Probennahmen (Kapitel 2.2.2.4) erfolgten nach 0 h bzw. 4 h. Die Zellkulturversuche sowie die sich anschließenden Microarray-Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt, um exaktere und sicherere Ergebnisse zu erhalten. Die RNA-Extraktion und RNA-Qualitätskontrolle, sowie die Microarray-Analysen wurden von Herrn Dr. Koczan des Instituts für Immunologie der Medizinischen Fakultät (Universität Rostock) durchgeführt. Es wurden Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays der Firma Affymetrix verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GCOS1.4. Die durch die fünf Varianten beeinflussten zellulären Genexpressionsmuster fielen dabei in der Anzahl der induzierten Transkripte sehr unterschiedlich aus. In HBxCAG-transduzierten HepG2-Zellen wurden 388 von 54.676 Transkripten (0,71 %) im Vergleich zu den untransduzierten HepG2-Zellen induziert. Von diesen wiesen 34 Transkripte einen p-Wert von kleiner 0,001 und eine Signal Log Ratio von größer/gleich 1,0 auf. In

HBxCTA transduzierten HepG2-Zellen waren 532 von 54.676 Transkripten (0,97 %) induziert, wovon 56 Transkripte die bereits bei HBxCAG-beschriebenen zusätzlichen Kriterien erfüllten. Zusammenfassend wurden für die Varianten HBxTAG, HBxTTA und HBxPolyLysin 426 (0,78 %), 336 (0,61 %) und 297 (0,54 %) Transkripte induziert, wovon entsprechend 31, 29 bzw. 25 Transkripte die Kriterien $p\text{-Wert} < 0,001$ und $\text{Signal Log Ratio} \geq 1,0$ aufwiesen. Eine $\text{Signal Log Ratio} \geq 1$ bei allen 4 Kreuzvergleichen entspricht dabei einer mindestens zweifachen Mengenzunahme der entsprechenden mRNA.

Die bei allen fünf Varianten induzierten 15 Transkripte sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst. Diese sind mit ihren Funktionen u. a. in die Signaltransduktion, Zelladhäsion, Metallionen-Kontrolle, Apoptose-Regulation und Immunantwort involviert.

Tabelle 3-9: Liste der übereinstimmend induzierten Gene des Genexpressionsprofils von HepG2-Zellen aller C2HBx- und HBxPolyLysin-cDNA-Microarrays. Angegeben sind die Accession-Nummer, der Gen-Titel, der Gen-Name und die Beschreibung des biologischen Prozesses, in dem das jeweilige Gen eine Rolle spielt. Zwei unabhängige cDNA-Microarray-Analysen wurden durchgeführt.

Accession-Nummer	Gen-Titel	Gen-Name	Beschreibung des biologischen Prozesses
1555340_x_at	RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family	Signaltransduktion
222227_at	---	---	Zelladhäsion
1555339_at	RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family	Signaltransduktion
205749_at	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	Antwort auf Hypoxie
217165_x_at	MT1F	metallothionein 1F	unbekannte Funktion
212777_at	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Signaltransduktion
212859_x_at	MT1E	metallothionein 1E	unbekannte Funktion
204326_x_at	MT1X	metallothionein 1X	Antwort auf Metallionen
208581_x_at	MT1X	metallothionein 1X	Antwort auf Metallionen
213629_x_at	MT1F	metallothionein 1F	unbekannte Funktion
206461_x_at	MT1H	metallothionein 1H	zelluläre Zinkionen-Homöostase
210538_s_at	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	Apoptose / Anti-Apoptose
227426_at	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Signaltransduktion
212780_at	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Signaltransduktion
202270_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	Immunantwort

Tabelle 3-10 fasst alle mRNAs zusammen, welche mindestens zweifach hochreguliert sind (wobei die gemessene Aktivierung von oben nach unten abnimmt) und zeigt farblich, welche Transkripte bei welchen HBx-Varianten auftreten und ob diese auch bei den jeweils anderen Varianten zu finden sind. So ist z. B. bei allen Varianten bis auf HBxCAG das Gen für Keratin 17 (KRT17) hochreguliert.

Das Interleukin 8 (IL8) wurde nur bei HBxPolyLysin nicht hochreguliert. Bei HBxTAG war, als einzige Variante, keine Zunahme des Transkriptes von Endothelin 1 (EDN1) zu verzeichnen. Epiregulin (EREG) wurde hingegen ausschließlich bei HBxCTA und HBxTTA hochreguliert. Besonders auffällig ist weiterhin, dass bei HBxCTA 19 Transkripte hochreguliert sind, die sonst bei keiner anderen Variante in dieser Liste zu finden sind. Dazu zählen Gene wie PDLIM5 und NFkBIZ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta).

Tabelle 3-10: Genexpressionsprofil in HBx-transduzierten HepG2-Zellen verglichen mit HepG2 ermittelt durch cDNA-Microarrays. Verglichen wurden die 4 C2HBx-Varianten sowie HBxPolyLysin. Alle Gene und Transkripte hatten einen p-Wert < 0,001 und eine Signal Log Ratio $\geq 1,0$. Farblich hinterlegt sind die in den jeweils verschiedenen Proben übereinstimmend vorgefundenen Gene. Details siehe Legende.

CAG	CTA	TAG	TTA	PolyLysin
Accession-Nr. Gen-Titel	Accession-Nr. Gen-Titel	Accession-Nr. Gen-Titel	Accession-Nr. Gen-Titel	Accession-Nr. Gen-Titel
1555340_x_at RAP1A	1555340_x_at RAP1A	1555340_x_at RAP1A	1555340_x_at RAP1A	1555340_x_at RAP1A
1555623_at ---	1555623_at ---	222227_at ---	222227_at ---	1555339_at RAP1A
233847_x_at ---	233847_x_at ---	1555339_at RAP1A	1555339_at RAP1A	222227_at ---
222227_at ---	222227_at ---	205749_at CYP1A1	205749_at CYP1A1	205749_at CYP1A1
1555339_at RAP1A	1555339_at RAP1A	205157_s_at KRT17	205157_s_at KRT17	1557354_at SOS1
234432_at ---	233822_x_at ---	1557354_at SOS1	217165_x_at MT1F	212777_at SOS1
205749_at CYP1A1	234432_at ---	212777_at SOS1	212777_at SOS1	205157_s_at KRT17
1557354_at SOS1	224354_at ---	212859_x_at MT1E	212859_x_at MT1E	217165_x_at MT1F
1560738_at ---	234623_x_at ---	202859_x_at IL8	202270_at GBP1	212780_at SOS1
217165_x_at MT1F	205157_s_at KRT17	230748_at SLC16A6	211506_s_at IL8	227426_at SOS1
212777_at SOS1	205749_at CYP1A1	211456_x_at MT1P2	202859_x_at IL8	226142_at GLIPR1
207038_at SLC16A6	1560738_at ---	217165_x_at MT1F	213629_x_at MT1F	213629_x_at MT1F
234623_x_at ---	217165_x_at MT1F	207038_at SLC16A6	230748_at SLC16A6	202270_at GBP1
212859_x_at MT1E	202270_at GBP1	212780_at SOS1	210538_s_at BIRC3	230337_at SOS1
204326_x_at MT1X	231577_s_at GBP1	204326_x_at MT1X	208581_x_at MT1X	212859_x_at MT1E
208581_x_at MT1X	207038_at SLC16A6	210538_s_at BIRC3	204326_x_at MT1X	204326_x_at MT1X
213629_x_at MT1F	212777_at SOS1	1560738_at ---	1560738_at ---	210538_s_at BIRC3
206461_x_at MT1H	210538_s_at BIRC3	211506_s_at IL8	211456_x_at MT1P2	231863_at ING3
204745_x_at MT1G	212859_x_at MT1E	208581_x_at MT1X	206461_x_at MT1H	231577_s_at GBP1
231577_s_at GBP1	230748_at SLC16A6	202270_at GBP1	227426_at SOS1	206461_x_at MT1H
230748_at SLC16A6	202859_x_at IL8	227426_at SOS1	212780_at SOS1	208581_x_at MT1X
210538_s_at BIRC3	213629_x_at MT1F	213629_x_at MT1F	212185_x_at MT2A	1554878_a_at ABCD3
202269_x_at GBP1	209774_x_at CXCL2	206461_x_at MT1H	204745_x_at MT1G	222802_at EDN1
210524_x_at ---	208581_x_at MT1X	212185_x_at MT2A	227915_at ASB2	229354_at AHRR
227426_at SOS1	204326_x_at MT1X	210524_x_at ---	202628_s_at SERPINE1	226136_at GLIPR1
212185_x_at MT2A	1560739_a_at ---	204745_x_at MT1G	205767_at EREG	
212780_at SOS1	206461_x_at MT1H	230337_at SOS1	205220_at NIACR2	
202270_at GBP1	211506_s_at IL8	231577_s_at GBP1	206924_at IL11	
202859_x_at IL8	228325_at KIAA0146	226142_at GLIPR1	222802_at EDN1	
216336_x_at MT1E /// MT1H	202269_x_at GBP1	202628_s_at SERPINE1		
205220_at NIACR2	210524_x_at ---	202269_x_at GBP1		
202628_s_at SERPINE1	227426_at SOS1			
222802_at EDN1	1557128_at FAM111B			
206924_at IL11	221994_at PDLIM5			
	212185_x_at MT2A			
	204745_x_at MT1G			
	212780_at SOS1			
	231863_at ING3			
	223217_s_at NFkBIZ			
	227915_at ASB2			
	217208_s_at DLG1			
	226142_at GLIPR1			
	218995_s_at EDN1			
	205767_at EREG			
	1557227_s_at TPR			
	1558924_s_at CLIP1			
	205220_at NIACR2			
	202628_s_at SERPINE1			
	231011_at LARP2			
	204840_s_at EEA1			
	222802_at EDN1			
	200621_at CSRP1			
	210136_at MBP			
	228603_at ---			
	203872_at ACTA1			
	200907_s_at PALLD			

Legende

bei allen aktiviert

nur bei einem aktiviert

bei CTA, TAG, TTA und PolyLysin aber nicht CAG

bei CAG, CTA, TAG und TTA aber nicht PolyLysin

CAG, CTA, TTA und PolyLysin aber nicht TAG

CAG, CTA, TAG und PolyLysin aber nicht TTA

CAG, CTA, TAG

CAG, TAG, PolyLysin

CTA, TAG, PolyLysin

CAG, CTA, TTA

CTA, TAG, TTA

TAG, PolyLysin

CTA, PolyLysin

CAG, TTA

CTA, TTA

TAG, TTA

CAG, CTA

In dieser Arbeit wurden die Microarray-Experimente, bezogen auf die herunterregulierten Transkripte, nicht untersucht. Diese Auswertungen werden anhand der vorliegenden Daten in näherer Zukunft durchgeführt, denn es ist davon auszugehen, dass ein ebenso differenziertes Bild der reduzierten Genexpression zu verzeichnen sein wird.

3.3. Studie mit Hepatitis-B-Virus Wildtyp

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass das Hepatitis-B-Virus X-Protein das Tumorsuppressorprotein p53 nicht nur bindet, sondern auch inaktiviert [53, 116]. Weiterhin wurde experimentell bewiesen, dass neben der direkten Interaktion mit p53, HBx möglicherweise inaktivierende Mutationen im p53-Gen induziert. Um zu verifizieren, welchen Einfluss HBx, p53 und deren Zusammenspiel auf die Genexpression der Hepatomazelllinie HepG2 und der humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie WI38 besitzen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollten dann auf Proteinebene bestätigt werden. Zu beachten ist dabei der p53-Status der einzelnen Zelllinien. HepG2-Zellen sind transformiert wodurch die p53-Regulation nicht mehr derjenigen von nicht-transformierten Zellen entspricht. WI38-Zellen weisen dagegen p53 auf Wildtyp-Basis auf.

3.3.1. Kinetik-Vorversuche zum Nachweis von HBxWt-mRNA

Als erstes sollte bestimmt werden, wann Hepatitis-B-Virus X-mRNA in messbaren Mengen intrazellulär nachweisbar ist. Dazu wurden sowohl HepG2- als auch WI38-Zellen mit Adenoviren transduziert, in welchen die Gensequenz des kompletten HBxSchröderWt von nt 1374 bis 1835 integriert worden ist (Kapitel 0). Probennahme (siehe Probennahme Microarray-Experimente Kapitel 2.2.2.4) und anschließende RNA-Extraktion (Kapitel 2.2.2.2) erfolgten nach 0, 1, 3, 6, 12 und 24 h. Diese verwendete HBx-Sequenz wird allgemein als Wildtypsequenz anerkannt und für Versuche eingesetzt. Sie besitzt keine Mutationen und weist die komplette HBx-Sequenz auf.

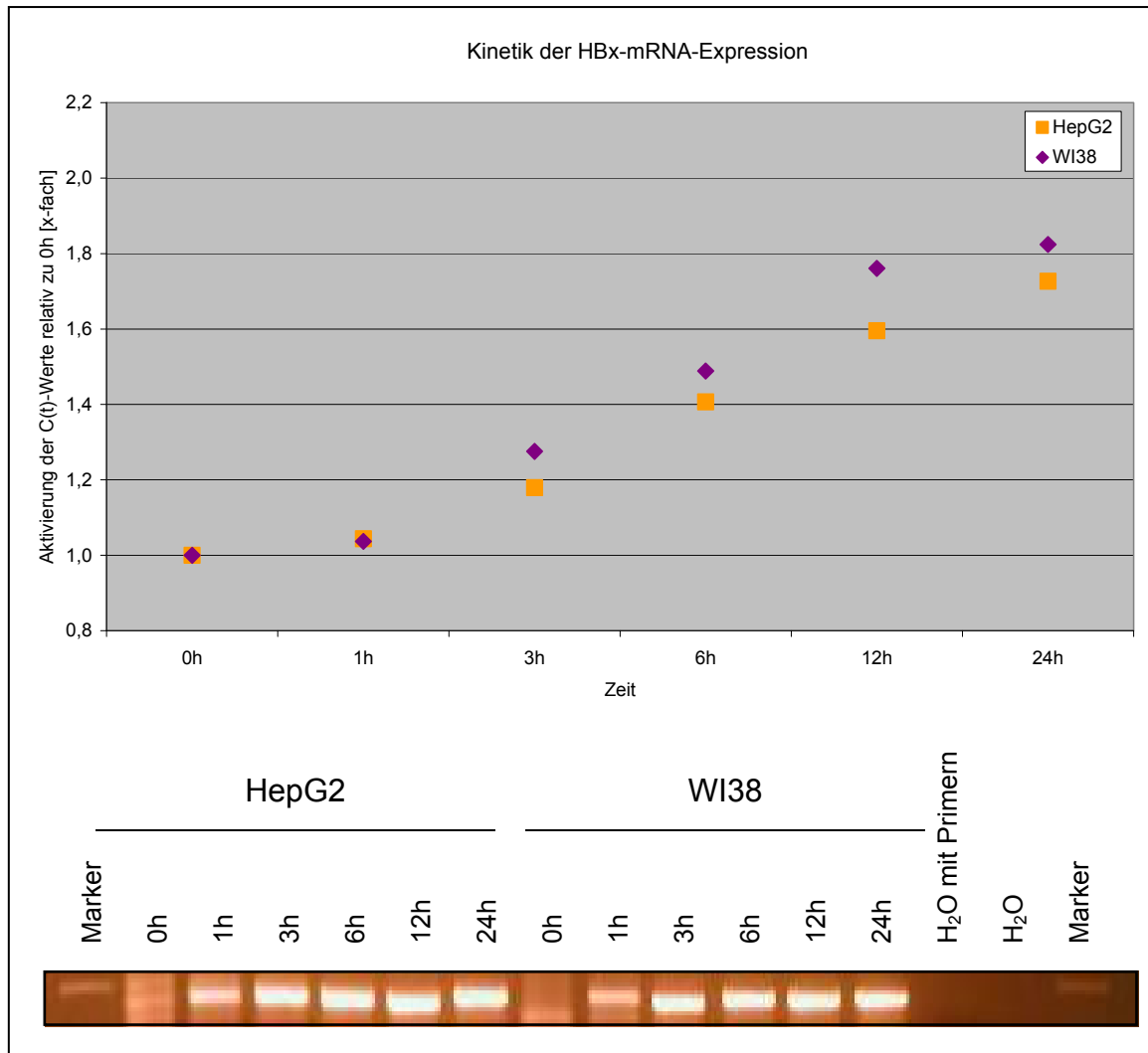


Abbildung 3-20: Kinetik der HBx-mRNA-Expression in mit adenoviralen HBxSchröderWt transduzierten HepG2- und WI38-Zellen. Dazu wurden je 1×10^6 Zellen entsprechend ihrer MOI transduziert. Die Zellen wurden im Anschluss nach 0, 1, 3, 6, 12 und 24 h geerntet und aufgearbeitet. Abschließend erfolgte eine SYBR-Green RT-PCR mit den Primern ChIP-1661-1679-s und ChIP-1820-1801-as in 45 Zyklen. Der C(t)-Wert nach 0 h wurde jeweils 1 gesetzt und die C(t)-Werte der Proben relativ dazu dargestellt. Das 2%ige Agarose-Kontrollgel wird unten gezeigt. Aufgetragen wurden die mittels PCR gewonnenen DNA-Amplifikate der unterschiedlichen Probennahmezeitpunkte. Zusätzlich wurden die PCR-Negativkontrollen H₂O mit Primern und H₂O, sowie der Marker aufgetragen. n = 1.

Gezeigt hat sich bei diesen Experimenten eine Zunahme der mRNA-Konzentration von 60 min bis zu 24 h (Abbildung 3-20). Dies trifft in gleichem Maße sowohl auf die HepG2- als auch die WI38-Zellen zu. Deshalb wurde der Zeitpunkt der Probennahme bei 4 h für die weiteren Versuche festgelegt.

3.3.2. Microarrays

Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression in HepG2- und WI38-Zellen, durch p53- und p53+HBx-Transduktion, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Dazu wurden beide Zelllinien mit p53-exprimierenden Adenoviren allein und einer Kotransduktion von p53- und HBx-exprimierenden Adenoviren transduziert. Das p53-exprimierende Adenovirus wurde freundlicherweise von Frau Prof. Pützer (Vektorologie und Experimentelle Gentherapie des Universitätsklinikum Rostock) zur Verfügung gestellt. Die Probennahme (Kapitel 2.2.2.4) erfolgte nach 0 h und 4 h, in deren Anschluss die Extraktion und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA stattfand. Nach Transkription in „first-strand“ cDNA und „second-strand“ Synthese erfolgte die *in vitro* Transkription um biotinylierte cRNA-Proben zu erhalten. Nach der Chip-Hybridisierung und Färbung wurden die Fluoreszenz-Intensitäten gescannt und auf Basis der Gesamtintensitäten mittels Software skaliert.

Die Ergebnisse der p53- und p53+HBx-Microarray-Analysen wurden zueinander bzw. zur reinen Zellkultur (= „0“-Wert) verglichen. Zur Veranschaulichung der großen Datenmengen sind die Ergebnisse graphisch in einem Streudiagramm (engl. *Scatterplot*) dargestellt. Die beobachteten Wertepaare zweier statistischer Merkmale werden dazu in ein kartesisches Koordinatensystem eingetragen. So erhält man Informationen über die Abhängigkeitsstrukturen der beiden Merkmale, die durch die Koordinaten repräsentiert sind.

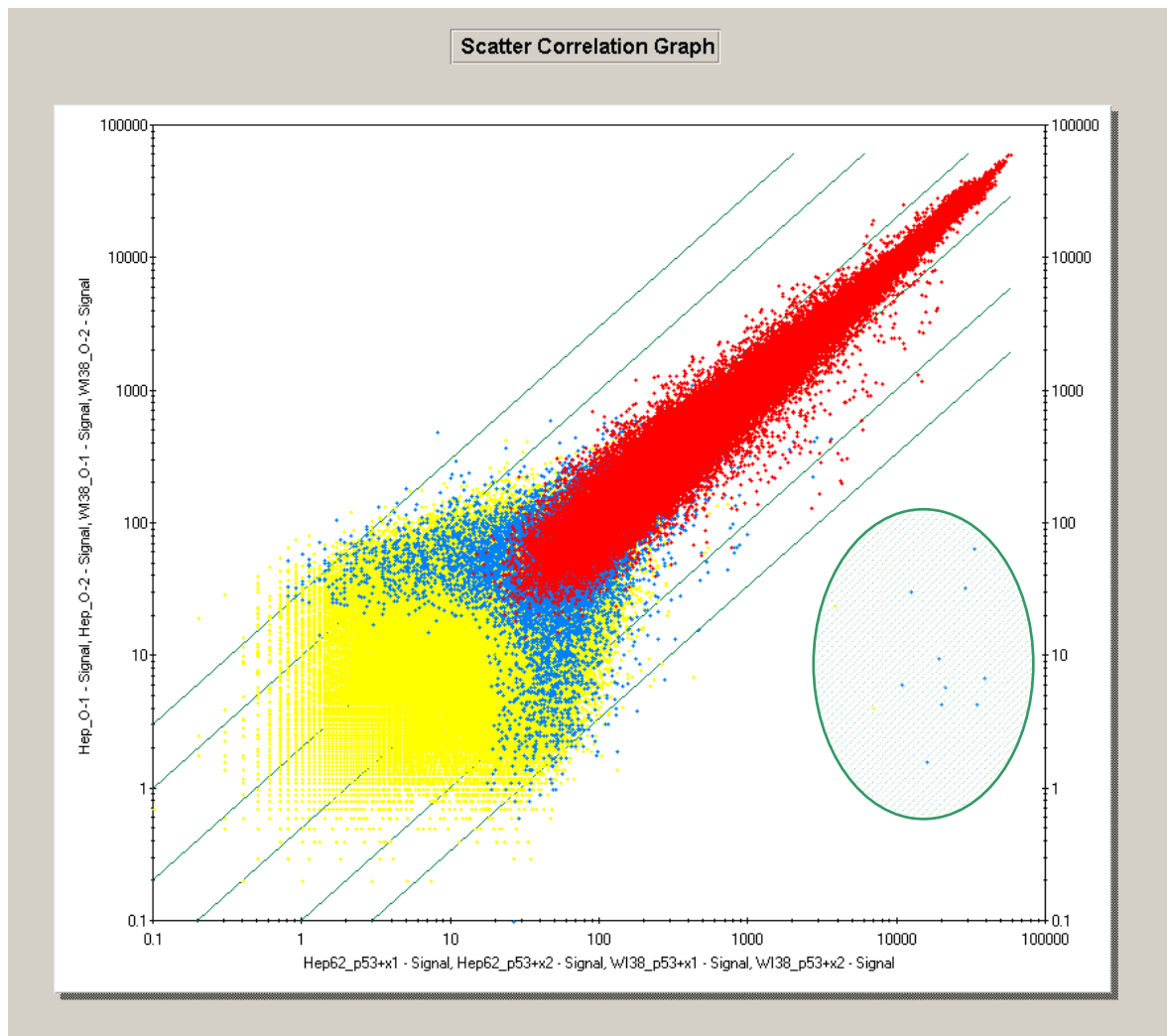


Abbildung 3-21: Streudiagramm-Analyse des Verhältnisses der Genexpression von HepG2- bzw. WI38-Zellen (0) zu denselben Zellen mit p53+HBx transduziert. Jeder Punkt entspricht einem Genhybridisierungssignal. Die X- und Y-Achse sind logarithmisch skaliert. Die nach Transduktion mit p53 und HBx hochregulierten Gene befinden sich in der rechten unteren Ecke. Entsprechend dem Detection Call sind gelbe Signalwerte „absent“, blaue „marginal“ und rote Signalwerte „present“. Die unter der grün-schraffierten Fläche befindlichen 10 blauen und 2 gelben Signalwerte verweisen auf signifikant hochregulierte Gene.

Im Streudiagramm (Abbildung 3-21) sind die Abhängigkeiten der zwei Merkmale 0 (= ohne Transduktion, 0 h) und p53+HBx in den beiden Zelllinien zueinander aufgetragen. Dazu wurden vier paarweise Kreuzvergleiche durchgeführt und die Signalwerte logarithmisch aufgetragen. Der Vergleich der p53+HBx-Signalwerte gegen die Zellkultur-Signalwerte zeigt eine erhöhte Genexpression von zwölf Signalwerten. Ob dieser Effekt auf p53 oder HBx zurückzuführen ist, sollte anhand des folgenden Streudiagramms (Abbildung 3-22) untersucht werden, bei welchem die p53- zu den p53+HBx-Werten aufgetragen worden sind.

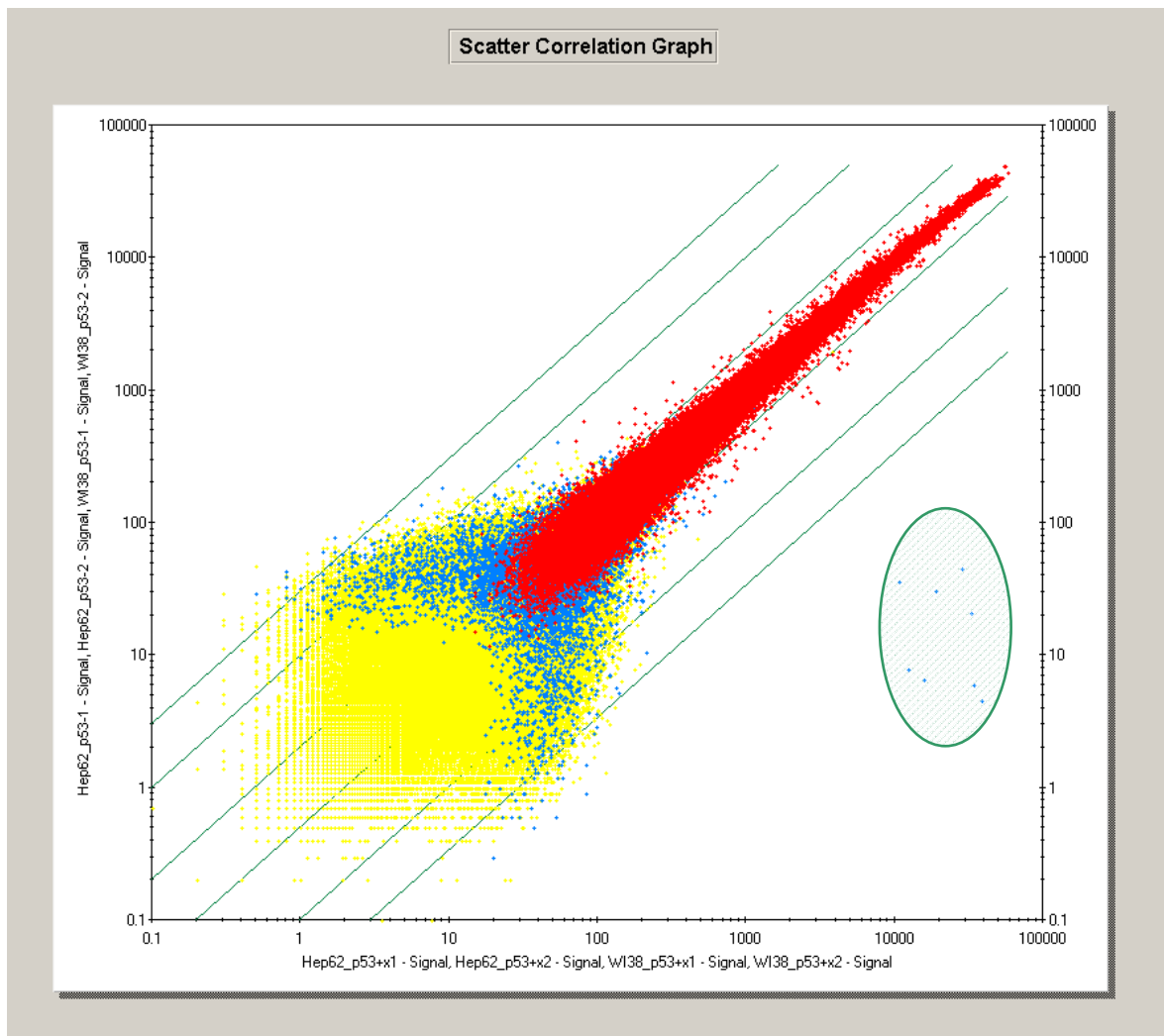


Abbildung 3-22: Streudiagramm-Analyse der Genexpression von p53+HBx transduzierten HepG2- und W138-Zellen zu ausschließlich mit p53 transduzierten Zellen. Die Signalwerte wurden logarithmisch aufgetragen, wobei jeder Punkt auch hier einem Genhybridisierungssignal entspricht. Acht hochregulierte blaue Signalwerte werden im Vergleich von p53+HBx zu p53 allein für beide Zelllinien angezeigt (grün schraffierte Fläche).

Die umrandeten Signalwerte zeigen, dass bei p53+HBx-Transduktion im Vergleich zur p53-Transduktion nur acht Signalwerte eine signifikante Hochregulierung der Genexpression aufweisen. Wie die folgende Tabelle 3-11 zeigt, repräsentieren die acht Signalwerte die Hochregulierung des Rap1A-Gens in beiden Zelllinien. Die vier im ersten Streudiagramm (Abbildung 3-21) zusätzlichen Signalwerte sind demzufolge auf p53 zurückzuführen und zeigen eine Erhöhung der Genexpression eines Gens mit der Accession-Nr. 222227_at in HepG2-Zellen. Es sind auch weitere Gene aufgrund des Einflusses von p53 bzw. p53+HBx auf die Genexpression induziert oder reprimiert worden. Jedoch soll sich die vorliegende Arbeit nur auf diese beiden Gene konzentrieren, da sie die mit Abstand

signifikantesten Unterschiede (bestimmt anhand der Signal Log Ratio) zur Genexpression in nicht-transduzierten Zelllinien aufwiesen. So verzeichnet die Induktion von Rap1A durch HBx in beiden Zelllinien einen Wert der Signal Log Ratio von circa 10, was auf einer Basis von 2 eine 20fache Aktivierung bedeutet. Für die durch p53 hervorgerufene Induktion des unbekannten Gens in HepG2-Zellen trifft dies ebenso zu. In WI38-Zellen findet eine 4-6fache Induktion statt. Die Signalwerte für Rap1A in HepG2-Zellen, hervorgerufen durch HBx, liegen dabei bei 33.000 im Mittelwert (14.000 in WI38-Zellen). Die durch p53 veränderte Genexpression erreicht Signalwerte im Mittel von 20.000 (HepG2-Zellen) bzw. 2.800 (WI38-Zellen).

Tabelle 3-11: Microarray-Analyse in tabellarischer Form. Die Tabelle enthält die Signalwerte der zwei Kandidatengene, welche im Streudiagramm signifikant hochreguliert sind. Die Angaben sind untergliedert in die jeweilige Zelllinie und die einzelnen Probenansätze mit den entsprechenden Signalwerten (SW) und Signal Log Ratios (SLR).

Gen-Titel (Accession-Nr.)	Zelllinie	Proben und deren Signalwerte				
		p53+HBx		p53		0
		SW	SLR	SW	SLR	SW
Rap1A (1555339_at)	HepG2	30.503	9	33	0	49
	WI38	11.559	8	22	0	19
Rap1A (1555340_x_at)	HepG2	36.120	11	11	-1	6
	WI38	17.298	11	19	1	6
Unbekanntes Gen (222227_at)	HepG2	20.206	11	19.879	10	5
	WI38	4.161	3	1.463	2	205

Zusammenfassend konnte eine Induktion des Rap1A-Gens durch HBx in beiden Zelllinien gezeigt werden. Das unbekannte Gen wurde in diesem Maße nur in HepG2-Zellen von p53 hochreguliert. Rap1A nimmt Funktionen in der Signaltransduktion, im Speziellen der small GTPase vermittelten Signaltransduktion, ein. Das unbekannte Gen wird mit Zelladhäsion und Signaltransduktion in Verbindung gebracht (Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: Erhalt von zwei differenziell hochregulierten Genen und Kategorisierung durch hochregulierenden Faktor.

hochreguliert durch	Accession-Nr.	Gentitel	biologischer Prozess
HBx	1555339_at bzw. 1555340_x_at	Rap1A	- Signaltransduktion - small GTPase vermittelte Signaltransduktion
p53 + minimalen zusätzlichen Effekt durch HBx	222227_at	unbekannt	- Zelladhäsion - Signaltransduktion

Im nächsten Schritt wurde geschaut, worin sich die zwölf (0, p53, p53+HBx: in beiden Zelllinien und im Doppelansatz) durchgeführten Microarrays am meisten unterscheiden. Dazu wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal components analysis (PCA)*) durchgeführt, welche eine statistische Technik zur Bestimmung von Schlüsselvariablen in einem multidimensionalen Datenset darstellt. Diese wird verwendet um Beobachtungsunterschiede zu erklären und die Analyse und Visualisierung der multidimensionalen Datensets zu vereinfachen. Je weiter die Arrays im Koordinatensystem von einander entfernt liegen, desto größer sind die jeweiligen Unterschiede in der Genexpression.

Zu sehen ist (Abbildung 3-23), dass die größten Unterschiede zwischen den Microarrays durch die unterschiedlichen Zelllinien hervorgerufen werden, denn alle im Koordinatensystem links liegenden Microarrays entstammen den HepG2-Proben, die sechs rechts befindlichen Microarrays den WI38-Proben.

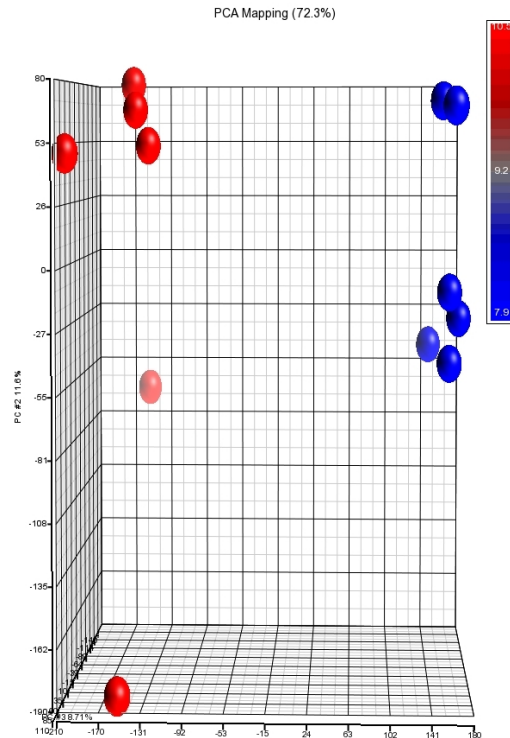


Abbildung 3-23: Hauptkomponentenanalyse der zwölf Microarrays. Dabei bewegen 54.676 Vektoren (entsprechend der auf dem Microarray befindlichen Gene) den Array in einem 54.676-dimensionalen Raum. Dieser wird dann vereinfacht dargestellt, in einen 3-dimensionalen Raum geplottet. Daraus ergeben sich Distanzen, welche durch einen Farbverlauf von rot zu blau differenziell zu unterscheiden sind. Die Analyse hat ergeben, dass die unterschiedliche Genexpression hauptsächlich auf zellkulturspezifische Unterschiede zurückzuführen ist, denn die roten Arrays basieren auf HepG2-Arrays und die blauen auf WI38-Arrays.

3.3.3. Rap1A-Expression in p53+HBx-transduzierten Zellen

Zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse und um die Unterschiede in den Expressionsmustern für Rap1A in HepG2- und WI38-Zellen mit p53- und p53+HBx-Transduktionen zu demonstrieren, wurde mit derselben bereits bei den Microarrays eingesetzten RNA eine RT-PCR durchgeführt. Diese soll mittels selektiver Primer Rap1A amplifizieren. Wie in Abbildung 3-24 zu sehen ist, konnte ausschließlich in den Proben von p53+HBx in beiden Zelllinien Rap1A in signifikant hohen Mengen nachgewiesen werden. Dass Rap1A auch in den anderen Proben minimal nachgewiesen wurde, kann ganz eindeutig darauf zurückgeführt werden, dass durch die große Zyklenzahl (45 Zyklen) der PCR selbst geringste Mengen Rap1A amplifiziert wurden. Ein PCR-Produkt wurde exemplarisch sequenziert, so dass auch auf diesem Weg Rap1A bestätigt wurde (Ergebnis nicht gezeigt).

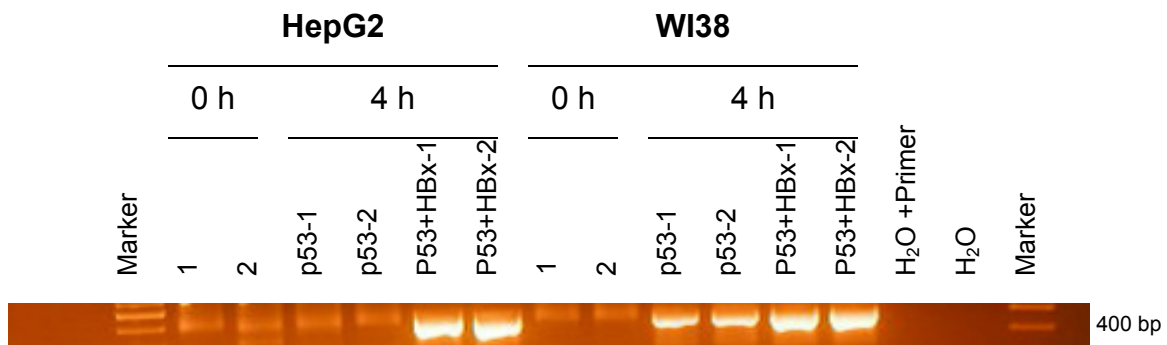


Abbildung 3-24: Ergebnisse der RT-PCR zur Bestätigung der Rap1A-Hochregulierung auf RNA-Ebene. Die für die Microarrays eingesetzte RNA wurde mittels SYBR-Green RT-PCR (45 Zyklen) und spezifischen Primern (RAP-241-260-s / RAP-620-604-as) in DNA umgeschrieben und amplifiziert. Je 10 µl wurden im Anschluss auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Sowohl für die HepG2- als auch die WI38-Ansätze wurden folgende Proben untersucht: 2x Zellkultur nach 0 h, 2x nach p53-Transduktion und 2x nach p53+HBx-Transduktion nach 4 h. Als PCR-Negativkontrollen wurden der PCR-Ansatz ohne Probe und H₂O mitgeführt. Der Marker GeneRuler 1 kB wurde ebenfalls aufgetragen.

3.3.4. In Planung

Weiterführende Untersuchungen sind in Planung. So soll Rap1A auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dazu werden erneut HepG2- und WI38-Zellen mit Adenoviren transduziert. Die Ansätze werden so gewählt, dass jeweils HBx, p53 und p53+HBx transduziert werden. Die Probennahmen erfolgen nach 0, 6 und 12 h. Im Anschluss soll die Aufarbeitung mit dem PARISTM-Kit erfolgen, welches ein schnelles, phenolfreies Verfahren zur parallelen Isolierung von Proteinen und Gesamt-RNA aus frisch kultivierten Säugerzellen darstellt. Die Gesamt-RNA wird anschließend zum Nachweis von Rap1A in eine RT-PCR eingesetzt.

Für den Nachweis, dass das gefundene Rap1A in aktiver Form vorliegt, würde sich noch ein letzter Versuch anschließen. Dazu würden erneut HepG2-Zellen mit HBx-Adenoviren transduziert und die Proben nach 0, 4, 5 und 6 h im Doppelansatz genommen. Mit Hilfe des Active Rap1 Pull-Down and Detection Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) würde dann der Nachweis aktiven Rap1As, anhand des Monitorings der RAP1 small GTPase-Aktivierung, erfolgen.

4. Diskussion

4.1. Vergleichende Analyse der Genotypen

Die Rolle der HBV-Genotypen mit Blick auf das Fortschreiten der HBV-Infektion hin zum Hepatozellulären Karzinom und potentiellen Behandlungsmöglichkeiten bleibt weiterhin von sehr großem Interesse. Da auch heute noch viele Details unbekannt sind, wurden in dieser Arbeit die Genotypen A bis I untersucht, um so einen bestmöglichen Gesamtüberblick über alle Genotypen zu erhalten

Dazu wurden die linearisierten HBV-Genome in HepG2-Zellen transfiziert. Dort rezirkularisierten diese, was zur Produktion zirkulärer HBV-DNA führte. Auf dieser Grundlage, konnte das Virus replizieren, was wiederum zur Herstellung des Virus in der Zelle führte. Ein gängiger Marker zum Nachweis von HB-Viren ist das HBsAg, welches die Gesamtheit der Oberflächenproteine der Virushülle darstellt. HBsAg wird als lösliche 20 nm-Partikel oder als Filamente ohne Assoziation zu Nukleokapsiden freigesetzt, aber auch als Umhüllung der Nukleokapside sezerniert. Es wurde geprüft, ob die Genotypen HBsAg produzierten, ob eventuell Unterschiede in der produzierten Menge HBsAg zu sehen waren und ob es Unterschiede zwischen intra- und extrazellulärem HBsAg gab. Eine im Vergleich zum extrazellulären HBsAg stark erhöhte Konzentration an intrazellulären HBsAg würde auf eine nicht erfolgreiche Virusfreisetzung hindeuten. Die erhaltenen Ergebnisse geben jedoch keinen Hinweis darauf. Intrazellulär konnte HBsAg bei den Genotypen A, B, C(TTA), D, E, F und H eindeutig nachgewiesen werden, C(CAG), G und I waren grenzwertig. Extrazelluläres HBsAg war nicht nachweisbar bei den Genotypen C(CAG bzw. TTA) und I. D und E waren grenzwertig, wohingegen A, B, F, G und H positiv waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass HBsAg prinzipiell intra- und extrazellulär nachgewiesen werden kann. C(CAG) und I produzierten in geringen Mengen intrazellulär HBsAg, sodass es extrazellulär unter der Nachweisgrenze lag. Ob diese Oberflächenproteine von infektiösen Viruspartikeln oder von „leeren“ HBsAg-Partikeln (= filamentöse oder sphärische Partikel ohne Kapside und DNA) stammen, kann allein an der Bestimmung des HBsAg nicht festgemacht werden. Im nächsten Schritt wurden Virionen und Nukleokapside nachgewiesen, wenn auch nur sehr schwach. Aufgrund der zur Positivkontrolle unterschiedlichen Laufverhaltens der Probenbanden besteht die

Möglichkeit, dass es sich bei der kleineren Bande um das 3,2 kB große unverpackte HBV-Genom und der größeren Bande um partiell verpackte Nukleokapside handeln könnte. Dann würde bei den Genotypen H, I und C(CAG) mehr unverpackte DNA vorliegen, wohingegen das Verhältnis bei Genotyp G ausgeglichen und bei den restlichen Genotypen bereits zu mehr partiell verpackter DNA verschoben wäre.

Zusammenfassend wurde mit diesen Versuchen die DNA-Replikation als erster Schritt der Virusvermehrung untersucht, der Nachweis von HBsAg und HBeAg als Infektionsmarker geführt und zumindest die partielle Verpackung der DNA nachgewiesen. Gravierende Unterschiede in der vergleichenden Genotypenanalyse sind dabei nicht aufgetreten.

4.2. Charakterisierung des Subgenotyp C2

Die in China am häufigsten vorkommenden HBV-Genotypen sind die Genotypen B und C [117]. Im Norden Chinas sind mehr als 90 % der HBV-Patienten mit dem Subgenotyp C2 infiziert, wohingegen in Südchina der Subgenotyp C1 vorherrscht [118]. Die vorliegende Arbeit basiert auf dem HBV-Ganzgenom eines HCC-Patienten mit dem Subgenotyp C2, welches amplifiziert und kloniert wurde. Diese Probe weist charakteristische Mutationen an den Nukleotidpositionen C1653T und die Doppelmutation A1762T/G1764A in der basalen Core-Promotor-Region auf. Um den Einfluss der jeweiligen HCC-assoziierten Variante auf Replikationszyklus, Transkription oder Funktionen des HBx zu untersuchen, wurden durch gerichtete Punktmutationen Isolate hergestellt, die alle möglichen Kombinationen dieser Varianten aufwiesen (CAG, CTA, TAG und TTA), ansonsten aber genetisch einheitlich waren. Weiterhin konnten erstmals Adenoviren von diesen vier Varianten des Hepatitis-B-Virus X-Proteins hergestellt und Untersuchungen auch in diesem genetischen Kontext durchgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass HepG2- und HuH7-Zelllinien nicht gleich gut für alle Untersuchungen geeignet sind, sondern dass Versuche mit HuH7-Zellen aussagekräftigere Ergebnisse liefern. Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien könnten u. a. auf Unterschiede in den Konzentrationen bestimmter Wirtszellfaktoren zurückzuführen sein, die z. B. vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängen [119]. Nach einer Hypothese von Suk *et al.* ist die von einem Hepatozellulären Karzinom abgeleitete HuH7-Zelllinie weniger stark differenziert

als die von einem Hepatoblastom abstammende Zelllinie HepG2 und weist niedrigere Konzentrationen an bestimmten, für die HBV-Replikation wichtigen Wirtszellfaktoren auf [120]. Je nach Variante könnte dies zum Replikationsvorteil oder -nachteil gegenüber dem Wildtyp werden.

Die virologischen Charakteristika des Wildtyp und der drei Varianten wurden anhand der HBsAg-, RNA- und DNA-Konzentrationen untersucht. Die dabei festgestellte starke Erhöhung der PräCore/Core-RNA bei CTA im Vergleich zu den anderen drei Konstrukten wurde so bislang noch nicht gesehen. Günther *et al.* haben in ihren Northern Blot-Analysen keine signifikanten Veränderungen beim PräC und prägenomischen/C-mRNA-Level zwischen den Konstrukten CAG und TTA gesehen [121]. Dasselbe gilt für die Northern Blot-Untersuchungen von Buckwold *et al.* [89]. Die anderen beiden Varianten (CTA und TAG) haben sie nicht untersucht. Im weiteren Verlauf führten beide Gruppen Primer-Extensions-Versuche durch, da diese die Möglichkeit boten, zwischen PräCore- und Core-RNA zu unterscheiden. Dabei zeigten sie, dass die Core-RNA sowohl von CAG als auch TTA in gleichen Mengen aufzufinden war, jedoch die PräCore-RNA von TTA signifikant vermindert produziert wurde. Wie das Verhältnis von PräCore- zu Core-RNA für die vier betrachteten Konstrukte, im Besonderen bei CTA aussieht, wird im Rahmen weiterführender Untersuchungen in Zukunft ebenfalls detailliert analysiert.

Wenn man jedoch davon ausgeht, dass nicht C1653 die pg/pcRNA erhöht, sondern T1653 zur Verminderung der pg/pcRNA und T1762/A1764 eigentlich initial zu einer verstärkten Replikation führen, kann folgende Hypothese entwickelt werden. T1653 übt einen dominant negativen Effekt auf den aktivierenden Effekt von T1762/A1764 aus. Dies wiederum steht im Einklang mit der starken Erhöhung der pg/pcRNA bei CTA im Vergleich zu den anderen drei Varianten.

Weiterhin war es möglich eine Abnahme der HBsAg-Konzentration von TTA gegenüber CAG in HuH7-Zellen noch dramatischer zu verdeutlichen als es Günther *et al.* mit ihren Experimenten gezeigt haben. Die durchgeführten Northern Blot-Analysen in HuH7-Zellen geben einen Hinweis darauf, dass der PräS/S-mRNA-Level bei TTA im Vergleich zu CAG stark reduziert wurde, was auf einen Einfluss dieser Mutationen auf die Enhancer II-Funktion hindeutet. Denn der Enh II aktiviert die S-Promotoren. Wenn nun T1653 die Enhancer II-Funktion dominant vermindert, verringert sich folglich auch die RNA-Menge. Die

Untersuchungen von Günther *et al.* zeigten ebenfalls entsprechende Ergebnisse, jedoch in geringerem Maße.

Generell ist der HBV-Enhancer II ein *cis*-aktivierendes Element, welches essenziell für die Expression von HBV-Genen und die virale Replikation ist. Untersuchungen in Leberzelllinien wie HepG2, HuH7 und HuH6, und in Nichtleberzellen wie HeLa und CV-1 zeigten, dass leberspezifische Faktoren wichtig für die Aktivität des Enh II sind [58, 122, 123]. So wurde gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren wie HNF1, HNF3, HNF4, FTF und andere die Genexpression mittels Enhancer II-Interaktion regulieren [63, 124-126]. *Trans*-aktivierende Faktoren, namentlich HLF, FTF und E4BP4, welche die HBV-Genexpression regulieren, wurden von Ishida *et al.* mittels eines Yeast-one-hybrid-Systems identifiziert [62]. HLF und E4BP4 sind bZIP-Transkriptionsfaktoren [127-129], FTF wurde als „orphan nuclear receptor“ charakterisiert [125, 130]. Ishida *et al.* zeigten, dass diese Transkriptionsfaktoren im Sequenzbereich zwischen nt 1640 und nt 1663 binden und verschiedene Effekte auf die transkriptionelle Regulation besitzen [62]. Da der C1653T-Austausch in diesem Bereich liegt, interessierte besonders, ob es aufgrund dieses Austausches zu Veränderungen in der transkriptionellen Regulation kommt. Für diese Untersuchungen wurden pFLAG-Konstrukte genutzt, die freundlicherweise von Herrn Dr. Hayashi (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt wurden. Die transkriptionelle Regulation wurde in HepG2- und HuH7-Zellen analysiert. Ishida *et al.* verwendeten für die Luciferase-Assays u. a. den Sequenzbereich zwischen nt 1640 und nt 1663, die vorliegende Arbeit den Bereich zwischen nt 1590 und nt 1686 mit den Konstrukten von CTA und TTA [62]. Beide Arbeiten zeigen, dass HLF einen sehr stark *trans*-aktivierenden, FTF einen leicht aktivierenden und E4BP4 einen reprimierenden Effekt besitzen. Dieser E4BP4-Effekt wurde ebenfalls von Lai und Ting beschrieben [131]. Für die Repression von E4BP4 gibt es bislang zwei mögliche Erklärungen. Einerseits kann die Repression von E4BP4 durch eine Interaktion der E4BP4-Repressionsdomäne mit dem TATA-bindenden Protein-bindenden Repressor-Protein Dr1 verursacht werden [132]. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass E4BP4 mit HLF oder anderen Faktoren um dasselbe Bindungsmotiv kämpft und so die Transkription reprimiert [62]. Einen Einfluss der C1653T-Mutation auf die transkriptionelle

Regulation dieser drei Transkriptionsfaktoren konnte anhand der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob die drei Transkriptionsfaktoren ebenfalls einen Effekt auf die HBV-RNA-Transkription ausüben und ob es eventuell Unterschiede zwischen den untersuchten Varianten gibt. Nach Kotransfektion mit den HBV-Ganzgenom-Monomeren konnte in HuH7-Zellen bei HLF eine erhöhte Expression der 3,5 kB-mRNA gegenüber FTF und E4BP4 gesehen werden, jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der 2,4/2,1 kB mRNA aller Proben. Diese Daten der HBV-RNA-Expression sind nicht übereinstimmend mit den ebenfalls ermittelten HBsAg-Konzentrationen der aus den Zellkulturüberständen entnommenen und mittels ELISA untersuchten Proben. Denn obwohl bei keiner Probe signifikante Unterschiede bei der Expression der 2,4/2,1 kB mRNA zu erkennen waren, sind die HBsAg-Konzentrationen sehr unterschiedlich. Die Kotransfektionen mit HLF in HuH7-Zellen weisen bei allen vier Konstrukten die höchsten HBsAg-Konzentrationen auf, wobei jedoch die HBsAg-Konzentration in Kombination von HLF mit TTA am niedrigsten und bei TAG am höchsten ist. Anders verhält es sich in HepG2-Zellen. Dort sind die HBsAg-Konzentrationen bei FTF am höchsten, was mit den Ergebnissen von Ishida *et al.* korreliert. Ishida *et al.* vermuteten anhand ihrer Daten, dass HLF die CURS-Aktivität hochreguliert, um so spezifisch den Core-Promotor zu beeinflussen. Deshalb untersuchten sie im nächsten Schritt, ob es Unterschiede zwischen den beiden (prägenomische oder PräC-mRNA) die 3,5 kB ausmachenden mRNAs gibt. Sie konnten zeigen, dass die prägenomische mRNA in einem noch größeren Maße durch HLF hochreguliert wird, als die PräC-mRNA. Dieses Ergebnis zeigt ihrer Meinung nach, dass HLF eine entscheidende Rolle bei der viralen Replikation in Hepatozyten spielt. Denn die Synthese von prägenomischer mRNA stellt einen ausschlaggebenden Schritt im Replikationszyklus von HBV dar, da die prägenomische mRNA sowohl für das Core-Protein als auch für die Polymerase kodiert. Was die Varianten-spezifischen Unterschiede in der HBsAg-Expression in Abhängigkeit von der HLF-Überexpression verursacht, lässt sich mit den bekannten Daten nicht erklären. Wie auch bei der HBsAg-Produktion ohne kotransfizierte Transkriptionsfaktoren hatte der Austausch von C1653>T1653 einen Einfluss. Die Variante T1653 führt also höchstwahrscheinlich zur Bindung neuer unbekannter Transkriptionsfaktoren, die in komplexer Weise die Transkription im viralen Enh II und mittelbar in den S-Promotoren beeinflussen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob aufgrund der T1653-Mutation ein zusätzliches Promotorelement existiert, da durch diese Mutation eine perfekte palindromische Sequenz nt 1648-TCTTATATAAGA entsteht. Eigene Untersuchungen mit der Software MatInspector (Genomatix) sagen mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein eines Promotors an dieser Stelle voraus, wenn die T1653-Mutation vorhanden ist, im Gegensatz zum Wt mit C1653 bei dem das Programm keinen Promotor vorhersagt. Auf Basis dieser Daten wurde im ersten Schritt mittels Luciferase-Assays (Vektoren pGL3-Basic-nt 1590-1686 C1653 bzw. T1653) untersucht, ob eine erhöhte Promotoraktivität der T1653-Variante vorliegt. Dies konnte so nicht gezeigt werden. Die *in vivo*-Untersuchungen mittels ChIP-Analyse bestätigten dieses Ergebnis, denn es konnte keine erhöhte Bindungsrate von TATA-bindendem Protein bei den vier Varianten (CAG, CTA, TAG und TTA) nachgewiesen werden. Diese Daten gehen einher mit früheren Veröffentlichungen von Günther *et al.* welche in ihrem verwendeten Sequenzkontext, der Zelllinie und der weiteren vorhandenen Mutationen, wenn überhaupt, nur einen geringen Effekt auf die präC/C-mRNA-Transkription und Virusreplikation zeigen konnten [121]. Selbst die Verdopplung der kompletten Box- α führte nur zu einer 30%igen Aktivierung des Core-Promotors in HuH7-Zellen [133]. Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Yuh *et al.*, welche zeigten, dass die Box- α -Elemente (nt 1646-1668) individuell die Promoteraktivität mehr als 100fach stimulierten [54]. Ebenso zeigten Ito *et al.*, dass die T1653-Mutation im Zusammenhang mit der BCP-Mutation, das Risiko eines Patienten mit HBV-Genotyp C-Infektion an einem HCC zu erkranken erhöht [91]. Auch wenn die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keinen eindeutig steigernden Effekt auf die Promotoraktivität aufzeigten, so bestätigen die nachfolgenden Ergebnisse doch, dass der Bereich zwischen nt 1596 – nt 1686 Promotoraktivität aufweist.

Einen Bereich zwischen nt 1397 und nt 1677 kartierten auch Chol *et al.* als Promotorregion und nannten ihn „kleinen HBx-Promotor“ [134]. Dieser Promotor ist unabhängig sowohl vom HBx-Promotor, welcher in einer Region 140 bp stromaufwärts des ersten ATG-Kodons des HBx-ORFs kartiert wurde [135, 136], als auch allen weiteren viralen Promotoren. Beispiele für ebensolche intragenen Promotoren gibt es u. a. beim humanen Foamyvirus [137] und HTLV-1 [138]. Zheng *et al.* veröffentlichten Ergebnisse, dass der 5'-Bereich des HBx-ORF mittels

Promotorfunktion dafür verantwortlich sei, die Expression der kleinen HBx-Gentranskripte zu regulieren, welche innerhalb des HBx-ORF aufgrund von heterogenen 5'-Enden entstehen [139]. Nach den kleinen HBx-Gentranskripten suchten sie, da es drei Methionin-Translationsinitiationskodons im HBx-ORF an den Positionen 1, 79 und 103 gibt, was dazu führen würde, dass mindestens drei Proteine mit 17, 8,6 und 5,9 kDa vom HBx-Gen entstehen, wovon die beiden letztgenannten Proteine aminoterminal verkürzt sind. Diese Möglichkeit ist äußerst attraktiv, da das Virus in derselben Weise multiple Proteine des Envelope-, Core- und Polymerase-ORFs generiert (Übersichtsarbeit: [140]). Ursprünglich konnten Kwee *et al.* in ihren Untersuchungen ausschließlich eine einzige Art HBx-mRNA nachweisen, wobei die entstehenden drei HBx-Proteine sowohl allein, als auch in Kombination miteinander, verschiedene transkriptionelle Regulatoraktivitäten besitzen [141], was so auch bereits bei anderen Proteinen gezeigt worden ist [142, 143]. Zheng *et al.* zeigten hingegen, dass es ebenfalls kleinere HBx-Gentranskripte gibt, welche aktive HBx-Proteine synthetisieren [139]. Die Startpunkte der vier Haupttranskripte (ohne das große HBx-Transkript) detektierten sie mittels Primer-Extensionsanalyse an den Positionen nt 1532, nt 1573 (stromaufwärts des zweiten ATGs lokalisiert), nt 1627 und nt 1634 (zwischen dem zweiten und dritten ATG). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen und erweitern diese Erkenntnisse (Abbildung 4-1). Dazu wurden drei verschiedene Systeme zur Untersuchung genutzt – adenovirale Vektoren mit integrierter HBx-Sequenz, HBV-Ganzgenome und von Patienten gewonnene Leberbiopsie-Proben. Mit Hilfe der adenoviralen Transduktion der vier verschiedenen C2-Konstrukte konnten bei allen vier Varianten mRNAs mit einem Start vor nt 1374 nachgewiesen werden, welche der mRNA des „großen“ HBx entspricht. Die starke Expression wird durch den sehr starken im adenoviralen Vektor vorgeschalteten Promotor hervorgerufen, denn bei den Ganzgenomen ist diese mRNA ausschließlich bei TAG zu finden. Der mRNA-Start für das „kleine“ HBx-Transkript wurde an Position nt 1627/28 sowohl mit dieser Arbeit (adenoviral bei CTA, TAG, TTA; Ganzgenom bei CTA) als auch von Zheng *et al.* kartiert [139]. Den mRNA-Start vom „mittleren“ HBx kartierten sie bei nt 1532 bzw. 1573, was prinzipiell einhergeht mit den hier vorgelegten Daten bei nt 1547 (Ganzgenom TAG).



Abbildung 4-1: Kartierung der HBx-mRNA-Starts *in vitro* und *in vivo*. Dargestellt wurde exemplarisch die HBxTTA-Sequenz. Rot hervorgehobene Nukleotide verweisen auf die Mutationen nt 1653, nt 1762 und nt 1764. Blau wurden die Startkodons hervorgehoben. Orange Pfeile kennzeichnen die Positionen der kartierten HBx-mRNA-Starts *in vivo*, grün entsprechend *in vitro*.

Weiterhin konnte zusätzlich noch ein neuer mRNA-Start bei nt 1741 (adenoviral bei TAG, Ganzgenom bei CAG, CTA und TTA) nachgewiesen werden. Der Start dieser HBx-mRNA könnte zur Translation eines „mini“ HBx in Isolaten mit der HCC-assoziierten Variante T1762/A1764 führen, da durch diese Doppelmutation von A1762T/G1764A ein neues Startkodon im Leserahmen des HBx entsteht. Dieses Startkodon ist 20 Nukleotide vom Transkriptionsstart entfernt. Von dieser neuen mRNA könnte also ein „mini“ HBx, ein Peptid mit einer Länge von 24 Aminosäuren translatiert werden, das in seiner Sequenz dem für HBx-Funktionen essenziellen HBx-Carboxy-Terminus entspricht. Für welche Informationen die aus den Leberbiopsie-Proben und den adenoviralen Transduktionen von CTA, TTA und vielleicht auch CAG gewonnenen mRNAs mit den Starts um nt 1760 und nt 1770 zuständig sind, bleibt unklar. Der nächste bekannte mRNA-Start ist bei nt 1785 kartiert, wobei diese mRNA für das HBeAg-Protein kodiert. Um auszuschließen, dass die neuen Transkripte von Artefakten der DNA-Expression oder Zellkulturen entstehen, sollten die Ergebnisse mittels weiterer Versuche mit anderen Methoden überprüft werden. Zusammenfassend bestätigen und erweitern diese Ergebnisse Berichte von Zheng *et al.*, die mRNA-Starts an den Nukleotidpositionen nt 1532, nt 1573 und nt 1627 nachwiesen [139]. Die Signifikanz der kleinen HBx-Proteine im hepadnaviralen Lebenszyklus ist noch weitestgehend unbekannt, jedoch vermuten Zheng *et al.* anhand ihrer eigenen Ergebnisse [139] und der von Kwee *et al.* und Nakatake *et al.* [141, 144], dass die

kürzeren HBx-Proteine eine wichtige Funktion in der viralen Replikation spielen. Möglicherweise reprimieren sie die Transaktivierungs-Funktion der entsprechenden Vollängen-Proteine, wie es auch von anderen kleinen Varianten einiger Proteine (z. B. Drosophila E78 Protein und Papillomavirus E2 Protein) vermutet wird. Weiterhin halten Zheng *et al.* es für möglich, dass eine unabhängige Syntheseregulation der großen und kleinen HBx-Gentranskripte im viralen Lebenszyklus wahrscheinlich ist [139]. Dies wiederum könnte zu differenziellen Effekten auf die Genexpression in verschiedenen Phasen des Replikationszyklus führen.

Wie sich die Genexpressionsmuster der HepG2-Zellen nach Transduktion der vier HBxC2-Varianten und des ebenfalls untersuchten HBxPolyLysin unterscheiden, wurde anhand von Microarray-Analysen untersucht. Da HBx eine entscheidende Rolle in der HBV-bezogenen Pathogenese spielt, haben bereits einige Forschergruppen die mit HBx-assoziierten Genexpressionsprofile untersucht. Ihre Ergebnisse unterscheiden sich dabei merklich [145-147]. Dies ist z. B. aufgrund von verschiedenen Untersuchungsansätzen bezüglich der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen oder transformierter Zelllinien möglich. In dieser Arbeit wurden die Experimente in HepG2-Zellen durchgeführt. Mittels cDNA-Microarrays wurden Gene identifiziert und klassifiziert, welche bei allen HBx-Varianten gleichermaßen erhöht exprimiert wurden, aber ebenso differenziell exprimierte Transkripte. Dabei war auffällig, dass HBxCTA die größte Anzahl an differenziert-hochregulierten Genen aufwies, HBxPolyLysin die geringste Anzahl. Wiederum sind die drei ausschließlich bei HBxPolyLysin gefundenen Transkripte nicht wegweisend, um zu erklären warum HBxPolyLysin etwa 1.000fach stärker transformierend ist als HBxWt [100]. Hingegen haben Mau *et al.* mit ihrem COOH-terminal verkürztem HBx und Microarray-Experimenten zeigen können, dass alle vier hochregulierten Gene anti-apoptotische Funktionen, alle drei runterregulierten Gene pro-apoptotische Funktionen besitzen [148]. Zusammenfassend schlussfolgerten sie, dass das COOH-terminal verkürzte HBx eine wichtige Rolle in der karzinogenen HCC-Entwicklung via Aktivierung von Zellproliferation und dem Verlust von pro-apoptotischen Fähigkeiten besitzt.

Von den 64 im Versuchsansatz dieser Arbeit induzierten Transkripten sind 15 bei allen 5 Varianten hochreguliert. Die höchste Induktion aller Proben weist das Rap1A-Gen auf (hohe Induktion = weit oben in der Tabelle 3-9 bzw. Tabelle 3-10),

welches eine wichtige Aufgabe in der Signaltransduktion einnimmt. Dieses wird ausführlich in Kapitel 4.3 diskutiert. Weiterhin weist die Tabelle 3-9 unter anderem mRNAs von einem unbekannten Gen, welches allgemein im biologischen Prozess der Zelladhäsion eine Rolle spielt, einem Gen als Antwort auf Hypoxie (CYP1A1), viele verschiedene Gene der Familie der Metallothioneine, welche Schwermetalle binden, sowie Gene für die Signaltransduktion (SOS1), Apoptose (BIRC3) und Immunantwort (GBP1) auf. CYP1A1 mit seinen genetischen Polymorphismen wurde bereits von Yu *et al.* mit HCC unter chronischen Hepatitis B-Trägern in Verbindung gebracht [149]. Ebenso untersuchten Oyama *et al.* die Expression von CYPs (Cytochrome P450s) in Tumorgewebe und deren Assoziation mit der Krebsentwicklung [150]. Die bekannten Funktionen von Metallothioneinen (MT) schließen die metalloregulatorische Rolle in Zellwachstum und Differenzierung ein, ebenso wie die verstärkte Synthese von MTs in schnell proliferierenden Geweben, was auf eine wichtige Rolle dieser im normalen als auch neoplastischen (entarteten) Zellwachstum hindeutet [151, 152]. Datta *et al.* berichten, dass die Mengen von MT1 und MT2A in primären humanen HCCs drastisch reduziert sind [153]. Wie sich die Konzentrationen der in dieser Arbeit aufgefundenen einzelnen Subtypen des MT1-Proteins unterscheiden, haben sie jedoch nicht untersucht. Unterschiedliche MT-Gene spielen wahrscheinlich verschiedene funktionelle Rollen während der Entwicklung oder unter diversen physiologischen Bedingungen [154, 155]. Auffällig ist, dass das Gen KRT17 (Keratin 17) bei allen Konstrukten bis auf HBxCAG induziert wurde. Keratin 17 steht im Verdacht in die Tumorangio-genese involviert zu sein [156]. Hingegen tritt Interleukin 8 (IL8) nicht bei HBxPolyLysin auf, dafür bei allen anderen Konstrukten. Dieses Zytokin ist sowohl als Entzündungsmediator bei der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, in das entzündete Gewebe beteiligt, als auch ein Tumorangio-genesefaktor [157]. Es wird weiterhin seit kurzer Zeit diskutiert, dass das Endothelin 1 (EDN1) welches ausschließlich bei HBxTAG nicht induziert wird, in Verbindung mit verschiedenen Krebsarten steht, vor allem Prostata- [158] und Brustkrebs. Epiregulin (EREG) hingegen wird ausschließlich bei den Konstrukten HBxCTA und HBxTTA hochreguliert. Zwei Pekinger Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit den Zusammenhängen zwischen EREG und Hepatitis B. Dabei erkannte die erste Arbeitsgruppe, dass die Inhibierung von EREG die Ausbreitung von HBV in HepG2.2.15-Zelllinien blockiert, da Epiregulin

essenziell für die HBV-Ausbreitung zu sein scheint [159]. Die zweite Arbeitsgruppe zeigte, dass das duale Knock-down von N-ras und Epiregulin zu einer Inhibierung des Zellwachstums in Verbindung mit einem induzierten Zellarrest in der G0/G1-Phase führt [160]. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass bei den Konstrukten HBxCTA und HBxTTA aufgrund der Induzierung der EREG-mRNA die Ausbreitung von HBV erleichtert ist. Für die vier ausschließlich bei den Konstrukten HBxCAG und HBxCTA aktivierten Gene sind zum jetzigen Zeitpunkt weder Namen noch deren biologische Funktionen bekannt.

Die Daten zeigten weiterhin, dass 19 Gene ausschließlich bei HBxCTA hochreguliert werden, darunter ein Gen mit unbekanntem Namen, welches eine Rolle in der Translation im Cytoplasma spielt, und ein Gen mit dem Namen KIAA0146, bei welchem die Funktion bislang noch unklar ist. Das ebenfalls aktivierte Gen PDLIM5 [161] gehört zur Proteinfamilie der PDZ-LIM. Diese lässt erkennen, dass sie wichtige Aktivitäten auf dem zellulären Level, der Vermittlung von Signalen zwischen dem Zellkern und dem Zytoskelett, mit einem maßgeblichen Einfluss auf die Organentwicklung, einnimmt (Übersichtsarbeit von [162]). Eine Dysregulierung hingegen kann zur Entstehung von Krebs und einem Fortschreiten dessen führen. Abschließend soll noch das ebenfalls ausschließlich bei HBxCTA hochregulierte Gen für NFkBIZ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta) erwähnt werden. Dieses Gen spielt sowohl in der Entzündungsantwort wie auch bei der Transkriptionsregulation eine Rolle, indem es als NFkB-Bindungscofaktor fungiert [163]. Kim *et al.* zeigten, dass HBx die NFkB-Aktivität beim Zusammenwirken mit VBP1 (VHL binding protein 1) steigert [164]. Es gibt jedoch verschiedene weitere Wege wie HBx durch das Zusammenwirken mit anderen Proteinen NFkB aktiviert [165]. NFkB-Aktivierung wird mit der Entwicklung des HCCs, hervorgerufen durch HBV-Infektion, in Verbindung gebracht [166].

Zusammenfassend konnte anhand dieses Versuches ein identisches Repertoire an induzierten mRNAs bei allen vier HBxC2-Varianten und HBxPolyLysin nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite zeigten diese Microarrays, dass differenzielle Unterschiede ebenfalls vorhanden sind. So wurden zum Beispiel bei HBxCTA, welches Wildtyp bei nt 1653 und Variante T1762/A1764 ist, 19 Gene induziert, die ausschließlich dort zu finden waren. Die Variante T1762/A1764 ist zwar HCC-, noch stärker aber Leberzirrhose-assoziiert [90]. Ob die gefundenen

Gene eher Leberzirrhose- als HCC-assoziiert sind, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. HBxPolyLysin hingegen induziert als wahrscheinlich onkogenstes HBx die wenigsten Gene. Dies führt vielleicht zum Verlust von Funktionen, die für das Virus wichtig sind, akzentuiert aber die Funktionen die Krebs auslösen. Funktionelle Unterschiede und Übereinstimmungen konnten ebenfalls aufgezeigt werden. So besitzen z. B. Rap1A und SOS1 einen Einfluss auf die small GTPase-vermittelte-Signaltransduktion sowie auf die Ras-Protein-Signaltransduktion. Mit der Angiogenese werden Rap1A, Keratin17, IL8 und Epiregulin in Verbindung gebracht. Ebenso wurde gezeigt, dass Rap1A zusammen mit Rap1B die humane endotheliale Zellfunktion kontrolliert [167]. Dies tun sie möglicherweise in Zusammenhang mit dem ebenfalls aktivierten Endothelin. Weiterhin zeigte diese Arbeit einige Kandidatengene, die neue Einblicke in die HBx-vermittelte Pathogenese bieten. Letztendlich werden diese Ergebnisse helfen, neue diagnostische Marker zu etablieren, therapeutische Ziele aufzudecken und Medikamente zu entwickeln.

4.3. Einflüsse des HBxWt und p53 auf die Genexpression humaner Zelllinien

Die bislang in dieser Arbeit beschriebenen Genexpressionsuntersuchungen wurden mit Varianten des Hepatitis-B-Virus X-Proteins durchgeführt (siehe Kapitel 4.2). Welchen Einfluss das Wildtyp-Protein (HBxWt), auch im Zusammenspiel mit p53, auf die Genexpression von WI38- und HepG2-Zellen nimmt, wurde soweit bekannt, bislang noch nicht untersucht. Die durchgeführten Versuche lieferten das erstaunliche Resultat, dass zwei Gene über alle Maßen signifikant induziert wurden. Deshalb konzentriert sich die anschließende Diskussion ausschließlich auf diese beiden Gene.

Gezeigt wurde zum ersten Mal ein Einfluss von HBx auf die Rap1A-Genexpression. Bestätigt wurde dies durch die Ergebnisse der fünf anderen Varianten (HBxCAG, HBxCTA, HBxTAG, HBxTTA und HBxPolyLysin), welche im selben Verhältnis Rap1A-Aktivierungen zeigten. Rap1 ist ein Mitglied der Ras-Familie der small GTPasen und besitzt die größte Homologie zu Ras [168]. Rap1 bindet entweder an GTP oder GDP, wobei der Wechsel zwischen den beiden Zuständen einen molekularen Schalter darstellt [169]. Dabei koppelt es extrazelluläre Stimuli an intrazelluläre Effektoren indem es zwischen dem inaktiven GDP- und dem

aktiven GTP-Status wechselt (Übersichtsarbeit von [170]). Es existieren zwei sehr nah verwandte Rap1-Familienmitglieder, Rap1A und Rap1B, welche durch verschiedene Gene kodiert werden, aber 95 % Aminosäure-Übereinstimmung besitzen und wahrscheinlich sowohl sich ergänzende als auch divergente biologische Funktionen haben. Rap1 nimmt an vielen biologischen Prozessen teil, so wird es unter anderem mit der Modulation einer wachsenden Bandbreite der zellulären Antwort, einschließlich dem Kalzium-Signaling [171], Sekretion [171] und der synaptischen Übertragung [172] in Verbindung gebracht, wobei die als erste und am besten untersuchte zelluläre Funktion von Rap1 die Modulation der Integrin-vermittelten Adhäsion ist (Übersichtsarbeit von [173]). Weiterhin hat es Beachtung gefunden für seine Rolle in der Tumorangio-genese und der Krebsentwicklung [170]. *In vivo*- und *in vitro*-Studien lieferten den Beweis, dass anormale Rap1-Aktivierung zu verschiedenen bösartigen Tumoren einen Beitrag leistet [174]. Die Konsequenz der Rap1-Aktivierung auf die Invasion scheint einen sehr zell- und / oder umweltspezifischen Kontext zu haben (Beispiele in [175]). Jedoch bleibt bislang unklar, wann und in welchem Krebs Rap1-Signaling die Invasion und Metastasenbildung positiv oder negativ reguliert. So ist die Frage, ob die Rap1A-Aktivierung in HepG2- (humane HCC-Zelllinie) und WI38-Zelllinien (humane Lungenfibroblasten) dieselben Signalwege anschalten würde. Aus diesem Grund muss in weiteren Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* die Funktion der durch HBx hervorgerufenen Induktion des Rap1A-Gens analysiert werden. Ebenso stellt sich die Frage, ob HBx direkt mit Rap1A interagiert oder weitere Faktoren dazwischen geschaltet sind. Denn auch in HBV-assoziierten Lebererkrankungen sind viele verschiedene Wirkmechanismen vorstellbar.

Das zweite signifikant induzierte Gen wurde nach Kotransduktion von HBx+p53 gefunden, ebenso wie nach Transduktion von p53 allein in HepG2-, aber nicht in WI38-Zelllinien. Dieses Gen wurde bislang noch nicht benannt, jedoch werden seine Funktionen in der Zelladhäsion und der Signaltransduktion gesehen. Aufgrund der Tatsache, dass es bei beiden Transduktionen (HBx+p53 und p53 allein) aktiviert wird, wurde geschlussfolgert, dass p53 für die Induktion verantwortlich ist. Daraufhin wurde geprüft, ob eine Induktion dieses unbekannten Transkriptes ebenfalls bei den C2-Varianten in HepG2-Zellen stattfand. Dies konnte bestätigt werden, jedoch war die Induktion schwächer (Signalwerte im Mittel bei 3.000, Signal Log Ratio 7,5). HBxPolyLysin induzierte dieses Transkript

noch geringer als die Anderen (Signalwert im Mittel bei 150, Signal Log Ratio 3,5), war aber dennoch das Transkript, welches nach Rap1A die größte Aktivierung aufzeigte. Demzufolge wurde in HepG2-Zellen gezeigt, dass das unbekannte Gen auch ohne exogene Zugabe von p53 hochreguliert wird. Dies erfolgt jedoch mutmaßlich nur, da HepG2-Zellen transformiert sind. Obwohl p53 in HepG2-Zellen Wildtyp-Sequenz besitzt, entspricht die p53-Regulation nicht mehr derjenigen von nicht-transformierten Zellen wie WI38. Schlussfolgernd ist also auch die bei den C2-Varianten in HepG2-Zellen gemessene Induktion mittelbar auf p53 zurückzuführen. Diese findet jedoch in viel geringerem Maße statt, als die durch Kotransduktion mit p53 stimulierte Induktion. Warum HBxPolyLysin vergleichsweise schwach induziert, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Das p53-Protein ansich ist ein Tumorsuppressor, welcher in seiner aktivierten Form Apoptose und DNA-Reparatur vermittelt [176-178]. Es gibt sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Untersuchungen dazu, dass HBx Wildtyp-p53 bindet [179-182]. Die funktionelle Inaktivierung von p53 durch Komplexbildung mit HBx wird als alternativer Mechanismus für eine HCC-Entwicklung, verursacht durch eine HBV-Infektion, angesehen [179]. An welcher Stelle und in welcher Funktion das unbekannte Transkript, in den von p53 und HBx regulierten Signalkaskaden, eine Rolle spielt, wird Gegenstand zukünftiger höchst interessanter Arbeiten sein.

5. Zusammenfassung

Das Hepatitis-B-Virus wird aufgrund von Sequenzunterschieden des Virusgenoms in Genotypen und Subgenotypen unterteilt. Genotypen und Subgenotypen weisen eine geographisch unterschiedliche Verteilung auf. Sie beeinflussen ebenfalls den Verlauf der Erkrankung. Seit einigen Jahren ist man bemüht, Patienten eine individuelle geno- bzw. subgenotypspezifische Therapie zukommen zu lassen. Zum heutigen Zeitpunkt liegen jedoch noch wenige Informationen zum Behandlungserfolg vor, auch aufgrund des fehlenden Wissens über die molekularen Unterschiede der Genotypen.

In dieser Arbeit wurden erstmals parallel die Genotypen A bis I vergleichend untersucht. Dazu wurden Transfektionsversuche mit linearisierten HBV-Ganzgenomen durchgeführt. Der Nachweis der DNA-Replikation sowie der Infektionsmarker HBsAg und HBeAg und letztlich auch der DNA-Verpackung in Kapside, zeigten innerhalb des verwendeten Systems keine genotypspezifischen Unterschiede.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Varianten des Subgenotyps C2 analysiert. Auf Basis des HBV-Genoms eines HCC-Patienten (T1653, T1762/A1764) wurden, durch Einfügen von Punktmutationen, Varianten (CAG, CTA und TAG) kloniert und Adenoviren mit dem entsprechenden HBx-Gen hergestellt. Im Anschluss wurden Transfektionen und Transduktionen von Zelllinien durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. So übt die T1653-Mutation einen dominant negativen Effekt auf den generell aktivierenden Effekt der Doppelmutation T1762/A1764 aus. Dies erfolgt vermutlich durch die Bindung bislang unbekannter Transkriptionsfaktoren in dieser Region um nt 1653, welche Einfluss nehmen auf die Funktionen des Enhancer II. Dadurch wird mittelbar u. a. die Funktion der S-Promotoren beeinflusst. Jedoch hatte das Zusammenspiel der CTA- bzw. TTA-Varianten mit den drei Transkriptionsfaktoren HLF, FTF und E4BP4 keine Unterschiede aufgezeigt. Weiterhin konnte indirekt nachgewiesen werden, dass diese Region keine erhöhte Promotoraktivität aufgrund der T1653-Mutation erhält.

Mit Hilfe von RACE-Assays wurden verschieden große HBx-Transkripte entdeckt und deren Startnukleotide kartiert. Das Transkript für das „große“ HBx wurde isoliert, ebenso wie Transkripte für das „mittlere“ HBx (Start nt 1547), das „kleine“

HBx (Start nt 1627/1628) und ein „mini“ HBx (Start nt 1741). In HCC-Patienten mit der Mutation T1762/A1764 kann dieses „mini“ HBx-Transkript zur Produktion eines „mini“ HBx-Proteins führen. Die Funktionen der verschieden großen HBx-Transkripte müssen in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die Varianten beeinflussen die zelluläre Genexpression sehr differenziert, jedoch sind unter den induzierten Genen viele, die mit der Tumorangio-genese in Verbindung gebracht werden. HBxPolyLysin induziert unerwarteter Weise die wenigsten Gene, wohingegen HBxCTA (Wildtyp C1653 und Mutation T1762/A1764) die meisten Gene induziert. Auch dieses letztgenannte Ergebnis stützt die oben aufgestellte Hypothese, dass T1762/A1764 einen aktivierenden Effekt besitzt und C1653 diesen nicht negativ dominant unterdrückt.

Im dritten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, wie sich die Transduktion von HBxWildtyp und p53 auf die Genexpression der Zelle auswirkt. Es wurden dabei zwei Gene identifiziert, welche signifikant induziert wurden. Das ist zum Einen, dass durch HBxWildtyp induzierte Rap1A-Gen, das u. a. die Integrin-vermittelte Adhäsion und die Signaltransduktion moduliert. Zum Anderen, dass durch p53 induzierte Gen mit noch unbekanntem Namen, welches ebenfalls sowohl mit der Zelladhäsion als auch der Signaltransduktion in Verbindung gebracht wird. Welche Rolle diese Gene detailliert in der HBV-Infektion und weiter in der HCC-Entwicklung spielen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Zusammengefasst, geben die erhaltenen Ergebnisse einen Überblick über das Verhalten der Genotypen A bis I, die Charakteristik der Variantenunterschiede des Subgenotyps C2 und die Auswirkungen der Interaktion von HBx mit p53. Auf Basis dieses Wissens, wird es in einigen Jahren vielleicht möglich sein, HBV-Patienten noch individuellere Therapieangebote zu unterbreiten.

6. Literaturverzeichnis

1. Chisari, F.V. and C. Ferrari, *Hepatitis B virus immunopathogenesis*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 29-60.
2. Summers, J. and W.S. Mason, *Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate*. Cell, 1982. **29**(2): p. 403-15.
3. Miller, R.H. and W.S. Robinson, *Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(8): p. 2531-5.
4. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
5. Crowther, R.A., et al., *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy*. Cell, 1994. **77**(6): p. 943-50.
6. Dryden, K.A., et al., *Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 843-50.
7. Seitz, S., et al., *Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions*. Embo J, 2007. **26**(18): p. 4160-7.
8. Summers, J., A. O'Connell, and I. Millman, *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(11): p. 4597-601.
9. Schaefer, S. and W.H. Gerlich, *The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice 3e*. 2007: Blackwell Publishing: Oxford, pp 823-848.
10. Bartenschlager, R. and H. Schaller, *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription*. Embo J, 1988. **7**(13): p. 4185-92.
11. Hruska, J.F., et al., *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction*. J Virol, 1977. **21**(2): p. 666-72.
12. Landers, T.A., H.B. Greenberg, and W.S. Robinson, *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction*. J Virol, 1977. **23**(2): p. 368-76.
13. Moolla, N., M. Kew, and P. Arbuthnot, *Regulatory elements of hepatitis B virus transcription*. J Viral Hepat, 2002. **9**(5): p. 323-31.
14. Fukai, K., et al., *Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell*. Virology, 1997. **236**(2): p. 279-87.
15. Kann, M. and W.H. Gerlich, *Hepatitis B*. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 2005.
16. Chen, M.T., et al., *A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14913-8.
17. Millich, D. and T.J. Liang, *Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1075-86.
18. Bruss, V., et al., *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein*. Embo J, 1994. **13**(10): p. 2273-9.

19. Löffler-Mary, H., M. Werr, and R. Prange, *Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70*. Virology, 1997. **235**(1): p. 144-52.
 20. Kaneko, S. and R.H. Miller, *X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver*. J Virol, 1988. **62**(11): p. 3979-84.
 21. Arbuthnot, P., A. Capovilla, and M. Kew, *Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(4): p. 357-68.
 22. Bouchard, M.J. and R.J. Schneider, *The enigmatic X gene of hepatitis B virus*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 12725-34.
 23. Benhenda, S., et al., *Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis*. Adv Cancer Res, 2009. **103**: p. 75-109.
 24. Blum, H.E., et al., *Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro*. J Virol, 1992. **66**(2): p. 1223-7.
 25. Chen, H.S., et al., *The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1218-26.
 26. Zoulim, F., J. Saputelli, and C. Seeger, *Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 2026-30.
 27. Murakami, S., *Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator*. J Gastroenterol, 2001. **36**(10): p. 651-60.
 28. Andrisani, O.M. and S. Barnabas, *The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review)*. Int J Oncol, 1999. **15**(2): p. 373-9.
 29. Robinson, W.S., *Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma*. Annu Rev Med, 1994. **45**: p. 297-323.
 30. Slagle, B.L., et al., *Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene*. Mol Carcinog, 1996. **15**(4): p. 261-9.
 31. Terradillos, O., et al., *The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice*. Oncogene, 1997. **14**(4): p. 395-404.
 32. Leistner, C.M., S. Gruen-Bernhard, and D. Glebe, *Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus*. Cell Microbiol, 2008. **10**(1): p. 122-33.
 33. Schulze, A., P. Gripon, and S. Urban, *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1759-68.
 34. Glebe, D. and S. Urban, *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 22-38.
 35. Rabe, B., D. Glebe, and M. Kann, *Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5465-73.
 36. Rabe, B., et al., *Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9849-54.
-

-
37. Seifer, M., S. Zhou, and D.N. Standring, *A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in Xenopus oocytes*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 249-57.
 38. Albin, C. and W.S. Robinson, *Protein kinase activity in hepatitis B virus*. J Virol, 1980. **34**(1): p. 297-302.
 39. Bartenschlager, R. and H. Schaller, *Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome*. Embo J, 1992. **11**(9): p. 3413-20.
 40. Gerlich, W.H., et al., *Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase*. J Virol, 1982. **42**(3): p. 761-6.
 41. Hu, J., D.O. Toft, and C. Seeger, *Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids*. Embo J, 1997. **16**(1): p. 59-68.
 42. Sells, M.A., et al., *Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2836-44.
 43. Tuttleman, J.S., J.C. Pugh, and J.W. Summers, *In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus*. J Virol, 1986. **58**(1): p. 17-25.
 44. Wu, T.T., et al., *In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway*. Virology, 1990. **175**(1): p. 255-61.
 45. Summers, J., P.M. Smith, and A.L. Horwich, *Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification*. J Virol, 1990. **64**(6): p. 2819-24.
 46. Tuttleman, J.S., C. Pourcel, and J. Summers, *Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells*. Cell, 1986. **47**(3): p. 451-60.
 47. Gerelsaikh, T., J.E. Tavis, and V. Bruss, *Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4269-74.
 48. Miller, R.H., C.T. Tran, and W.S. Robinson, *Hepatitis B virus particles of plasma and liver contain viral DNA-RNA hybrid molecules*. Virology, 1984. **139**(1): p. 53-63.
 49. Watanabe, T., et al., *Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10205-10.
 50. Takada, S., et al., *Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system*. Virology, 1996. **216**(1): p. 80-9.
 51. Doitsh, G. and Y. Shaul, *HBV transcription repression in response to genotoxic stress is p53-dependent and abrogated by pX*. Oncogene, 1999. **18**(52): p. 7506-13.
 52. Lee, S.G. and H.M. Rho, *Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein*. Oncogene, 2000. **19**(3): p. 468-71.
 53. Truant, R., et al., *Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1851-9.
 54. Yuh, C.H., Y.L. Chang, and L.P. Ting, *Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4073-84.
-

-
55. Huang, J. and T.J. Liang, *A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7476-86.
 56. Guo, W.T., K.D. Bell, and J.H. Ou, *Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex*. J Virol, 1991. **65**(12): p. 6686-92.
 57. Shaul, Y., W.J. Rutter, and O. Laub, *A human hepatitis B viral enhancer element*. Embo J, 1985. **4**(2): p. 427-30.
 58. Yee, J.K., *A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus*. Science, 1989. **246**(4930): p. 658-61.
 59. Yu, X. and J.E. Mertz, *Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8719-26.
 60. Zhang, P., A.K. Raney, and A. McLachlan, *Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1472-81.
 61. Gilbert, S., et al., *The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1*. J Virol, 2000. **74**(11): p. 5032-9.
 62. Ishida, H., et al., *Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1241-51.
 63. Lopez-Cabrera, M., et al., *Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5069-73.
 64. Chen, I.H., C.J. Huang, and L.P. Ting, *Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3647-57.
 65. Grün-Bernhard, S., *Molekulare Determinanten der Infektiosität von Hepatitis B Virus Partikeln*. 2008, Justus-Liebig-Universität: Gießen.
 66. Preikschat, P., *Charakterisierung von Hepatitis B-Virus-Populationen in langzeit-immunsupprimierten Virusträgern im Verlauf der chronischen Hepatitis unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Core-Deletionsvarianten*. 2000, Humboldt-Universität Berlin.
 67. Okamoto, H., et al., *Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes*. J Gen Virol, 1988. **69** (Pt 10): p. 2575-83.
 68. Kurbanov, F., et al., *When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype?* J Virol, 2008. **82**(16): p. 8241-2.
 69. Kurbanov, F., Y. Tanaka, and M. Mizokami, *Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus*. Hepatol Res, 2010. **40**(1): p. 14-30.
 70. Norder, H., A.M. Courouce, and L.O. Magnius, *Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes*. Virology, 1994. **198**(2): p. 489-503.
 71. Naumann, H., et al., *Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 8): p. 1627-32.
 72. Stuyver, L., et al., *A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 1): p. 67-74.
-

-
73. Arauz-Ruiz, P., et al., *Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 8): p. 2059-73.
 74. Olinger, C.M., et al., *Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(11): p. 1777-80.
 75. Tran, T.T., T.N. Trinh, and K. Abe, *New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5657-63.
 76. Tatematsu, K., et al., *A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10538-47.
 77. Bowyer, S.M., et al., *A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 7): p. 1719-29.
 78. Kramvis, A., et al., *Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus*. J Med Virol, 2008. **80**(1): p. 27-46.
 79. Schaefer, S., *Hepatitis B virus genotypes in Europe*. Hepatol Res, 2007. **37**(s1): p. S20-6.
 80. Ozasa, A., et al., *Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection*. Hepatology, 2006. **44**(2): p. 326-34.
 81. Suwannakarn, K., et al., *A novel recombinant of Hepatitis B virus genotypes G and C isolated from a Thai patient with hepatocellular carcinoma*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 3027-30.
 82. Bottecchia, M., et al., *Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 11.
 83. Sanchez, L.V., et al., *Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G*. Intervirology, 2007. **50**(1): p. 9-15.
 84. Schaefer, S., *Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 14-21.
 85. Gunther, S., et al., *Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(2): p. 531-8.
 86. Gunther, S., et al., *Naturally occurring variants of hepatitis B virus*. Adv Virus Res, 1999. **52**: p. 25-137.
 87. Chen, R.Y., et al., *Effect of the G1896A precore mutation on drug sensitivity and replication yield of lamivudine-resistant HBV in vitro*. Hepatology, 2003. **37**(1): p. 27-35.
 88. Locarnini, S., J. McMillan, and A. Bartholomeusz, *The hepatitis B virus and common mutants*. Semin Liver Dis, 2003. **23**(1): p. 5-20.
 89. Buckwold, V.E., et al., *Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5845-51.
 90. Liu, S., et al., *Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(15): p. 1066-82.
-

-
91. Ito, K., et al., *T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(1): p. 1-7.
 92. Takahashi, K., et al., *Clinical implications of mutations C-to-T1653 and T-to-C/A/G1753 of hepatitis B virus genotype C genome in chronic liver disease*. Arch Virol, 1999. **144**(7): p. 1299-308.
 93. Tanaka, Y., et al., *Specific mutations in enhancer II/core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2006. **45**(5): p. 646-53.
 94. Hino, O., T. Kitagawa, and H. Sugano, *Relationship between serum and histochemical markers for hepatitis B virus and rate of viral integration in hepatocellular carcinomas in Japan*. Int J Cancer, 1985. **35**(1): p. 5-10.
 95. Imazeki, F., et al., *Integration of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 1986. **58**(5): p. 1055-60.
 96. Shafritz, D.A., et al., *Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens*. N Engl J Med, 1981. **305**(18): p. 1067-73.
 97. Takada, S., et al., *Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 822-8.
 98. Hilger, C., et al., *Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel polyadenylation site on viral DNA*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4284-91.
 99. Schutz, T., A. Kairat, and C.H. Schroder, *DNA sequence requirements for the activation of a CATAAA polyadenylation signal within the hepatitis B virus X reading frame: rapid detection of truncated transcripts*. Virology, 1996. **223**(2): p. 401-5.
 100. Rakotomahanina, C.K., et al., *Biological activities of a putative truncated hepatitis B virus X gene product fused to a polylysine stretch*. Oncogene, 1994. **9**(9): p. 2613-21.
 101. Hohne, M., et al., *Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA*. Embo J, 1990. **9**(4): p. 1137-45.
 102. Shirakata, Y., et al., *The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells*. Jpn J Cancer Res, 1989. **80**(7): p. 617-21.
 103. Lubber, B., et al., *Hepatoma-derived integrated HBV DNA causes multi-stage transformation in vitro*. Oncogene, 1996. **12**(8): p. 1597-608.
 104. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (USA). 1989.
 105. Gunther, S., et al., *A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5437-44.
 106. Putzer, B.M., et al., *Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy*. Gene Ther, 2000. **7**(15): p. 1317-25.
-

-
107. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
 108. Maruyama, K. and S. Sugano, *Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides*. Gene, 1994. **138**(1-2): p. 171-4.
 109. Schaefer, B.C., *Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends*. Anal Biochem, 1995. **227**(2): p. 255-73.
 110. Nelson, J.D., O. Denisenko, and K. Bomsztyk, *Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 179-85.
 111. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
 112. Takahashi, K., et al., *Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum*. J Immunol, 1983. **130**(6): p. 2903-7.
 113. Kramvis, A. and M.C. Kew, *Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy*. J Viral Hepat, 2005. **12**(5): p. 456-64.
 114. Chan, H.L., et al., *Epidemiological and virological characteristics of 2 subgroups of hepatitis B virus genotype C*. J Infect Dis, 2005. **191**(12): p. 2022-32.
 115. Kairat, A., et al., *Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age*. Intervirology, 1999. **42**(4): p. 228-37.
 116. Wang, X.W., et al., *Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2230-4.
 117. Zeng, G., et al., *Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China*. J Viral Hepat, 2005. **12**(6): p. 609-17.
 118. Wang, Z., et al., *Distribution and characteristics of hepatitis B virus genotype C subgenotypes in China*. J Viral Hepat, 2007. **14**(6): p. 426-34.
 119. Ninomiya, T., et al., *Expression ratio of hepatocyte nuclear factor-1 to variant hepatocyte nuclear factor-1 in differentiation of hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma*. J Hepatol, 1996. **25**(4): p. 445-53.
 120. Suk, F.M., et al., *Replication advantage and host factor-independent phenotypes attributable to a common naturally occurring capsid mutation (I97L) in human hepatitis B virus*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 12069-77.
 121. Gunther, S., N. Piwon, and H. Will, *Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653) --> T, A(1762) --> T and G(1764) --> A mutations in the core promoter*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 2): p. 375-80.
 122. Wang, Y., et al., *A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus*. J Virol, 1990. **64**(8): p. 3977-81.
 123. Yuh, C.H. and L.P. Ting, *The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function*. J Virol, 1990. **64**(9): p. 4281-7.
 124. Li, M., et al., *HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus*. Virology, 1995. **214**(2): p. 371-8.
-

-
125. Li, M., et al., *Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 29022-31.
 126. Wang, W.X., et al., *HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II*. Res Virol, 1998. **149**(2): p. 99-108.
 127. Cowell, I.G., A. Skinner, and H.C. Hurst, *Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(7): p. 3070-7.
 128. Hunger, S.P., et al., *Hlf, a novel hepatic bZIP protein, shows altered DNA-binding properties following fusion to E2A in t(17;19) acute lymphoblastic leukemia*. Genes Dev, 1992. **6**(9): p. 1608-20.
 129. Inaba, T., et al., *Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia*. Science, 1992. **257**(5069): p. 531-4.
 130. Galarneau, L., et al., *The alpha1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the Drosophila FTZ-F1 family*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3853-65.
 131. Lai, C.K. and L.P. Ting, *Transcriptional repression of human hepatitis B virus genes by a bZIP family member, E4BP4*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3197-209.
 132. Cowell, I.G. and H.C. Hurst, *Protein-protein interaction between the transcriptional repressor E4BP4 and the TBP-binding protein Dr1*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(18): p. 3607-13.
 133. Gunther, S., et al., *Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8318-31.
 134. Chol, C.Y., G.T. Park, and H.M. Rho, *A positive regulatory sequence of hepatitis B viral small X promoter*. Eur J Biochem, 1996. **239**(3): p. 579-87.
 135. Siddiqui, A., S. Jameel, and J. Mapoles, *Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(8): p. 2513-7.
 136. Treinin, M. and O. Laub, *Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 545-8.
 137. Lochelt, M., W. Muranyi, and R.M. Flugel, *Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7317-21.
 138. Nosaka, T., et al., *Novel internal promoter/enhancer of HTLV-I for Tax expression*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(22): p. 5124-9.
 139. Zheng, Y.W., et al., *Novel short transcripts of hepatitis B virus X gene derived from intragenic promoter*. J Biol Chem, 1994. **269**(36): p. 22593-8.
 140. Ganem, D. and H.E. Varmus, *The molecular biology of the hepatitis B viruses*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 651-93.
 141. Kwee, L., et al., *Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4382-9.
 142. McBride, A.A., R. Schlegel, and P.M. Howley, *The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity*. Embo J, 1988. **7**(2): p. 533-9.
-

-
143. Voss, J.W., T.P. Yao, and M.G. Rosenfeld, *Alternative translation initiation site usage results in two structurally distinct forms of Pit-1*. J Biol Chem, 1991. **266**(20): p. 12832-5.
 144. Nakatake, H., et al., *Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication*. Virology, 1993. **195**(2): p. 305-14.
 145. Hu, Z., et al., *Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1405-13.
 146. Ng, R.K., et al., *cDNA microarray analysis of early gene expression profiles associated with hepatitis B virus X protein-mediated hepatocarcinogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(3): p. 827-35.
 147. Zhang, W.Y., et al., *Gene expression profiles of human liver cells mediated by hepatitis B virus X protein*. Acta Pharmacol Sin, 2009. **30**(4): p. 424-34.
 148. Ma, N.F., et al., *COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5061-8.
 149. Yu, M.W., et al., *Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers*. Br J Cancer, 1999. **80**(3-4): p. 598-603.
 150. Oyama, T., et al., *Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 1967-76.
 151. Cherian, M.G., *The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 3**: p. 131-5.
 152. Thirumoorthy, N., et al., *Metallothionein: an overview*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(7): p. 993-6.
 153. Datta, J., et al., *Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2736-46.
 154. Jin, R., et al., *Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(3): p. 319-23.
 155. Kagi, J.H. and A. Schaffer, *Biochemistry of metallothionein*. Biochemistry, 1988. **27**(23): p. 8509-15.
 156. Xu, Y., et al., *Keratin 17 identified by proteomic analysis may be involved in tumor angiogenesis*. BMB Rep, 2009. **42**(6): p. 344-9.
 157. Brat, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 122-33.
 158. Albiges, L., et al., *[New drugs in metastatic castration-resistant prostate cancer]*. Bull Cancer, 2010. **97**(1): p. 149-59.
 159. Ding, X.R., et al., *Whole genome expression profiling of hepatitis B virus-transfected cell line reveals the potential targets of anti-HBV drugs*. Pharmacogenomics J, 2008. **8**(1): p. 61-70.
 160. Zhao, M., et al., *Dual knockdown of N-ras and epiregulin synergistically suppressed the growth of human hepatoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(2): p. 239-44.
 161. Wu, M., et al., *Cloning and identification of a novel human gene PDLIM5, a homolog of AD-associated neuronal thread protein (AD7c-NTP)*. DNA Seq, 2004. **15**(2): p. 144-7.
-

-
162. Krcmery, J., et al., *Nucleocytoplasmic functions of the PDZ-LIM protein family: new insights into organ development*. Bioessays, 2010. **32**(2): p. 100-8.
 163. Trinh, D.V., et al., *The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA*. J Mol Biol, 2008. **379**(1): p. 122-35.
 164. Kim, S.Y., et al., *Hepatitis B virus X protein enhances NFkappaB activity through cooperating with VBP1*. BMB Rep, 2008. **41**(2): p. 158-63.
 165. Su, F. and R.J. Schneider, *Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4558-66.
 166. Guo, S.P., et al., *Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus*. World J Gastroenterol, 2001. **7**(3): p. 340-4.
 167. Yan, J., et al., *Rap1a is a key regulator of fibroblast growth factor 2-induced angiogenesis and together with Rap1b controls human endothelial cell functions*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(18): p. 5803-10.
 168. Bos, J.L., J. de Rooij, and K.A. Reedquist, *Rap1 signalling: adhering to new models*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 369-77.
 169. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 153-208.
 170. Hattori, M. and N. Minato, *Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy*. J Biochem, 2003. **134**(4): p. 479-84.
 171. Kang, G., et al., *Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8279-85.
 172. Zhu, J.J., et al., *Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity*. Cell, 2002. **110**(4): p. 443-55.
 173. Bos, J.L., et al., *The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 1): p. 83-6.
 174. Kometani, K., et al., *Rap1 and SPA-1 in hematologic malignancy*. Trends Mol Med, 2004. **10**(8): p. 401-8.
 175. Bailey, C.L., P. Kelly, and P.J. Casey, *Activation of Rap1 promotes prostate cancer metastasis*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 4962-8.
 176. Farid, N.R., *P53 and other cell cycle regulators*. Cancer Treat Res, 2004. **122**: p. 149-64.
 177. Mills, A.A., *p53: link to the past, bridge to the future*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2091-9.
 178. Nakamura, Y., *Isolation of p53-target genes and their functional analysis*. Cancer Sci, 2004. **95**(1): p. 7-11.
 179. Feitelson, M.A. and L.X. Duan, *Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma*. Am J Pathol, 1997. **150**(4): p. 1141-57.
 180. Feitelson, M.A., et al., *Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 1993. **8**(5): p. 1109-17.
 181. Ueda, H., et al., *Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer*. Nat Genet, 1995. **9**(1): p. 41-7.
 182. Wang, X.W., et al., *Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene*. Cancer Res, 1995. **55**(24): p. 6012-6.
-

Publikationen

A new clade of hepatitis B virus subgenotype F1 from Peru with unusual properties. von Meltzer M, Vásquez S, Sun J, Wendt UC, **May A**, Gerlich WH, Radtke M, Schaefer S. Virus Genes. 2008 Oct; 37(2):225-30. [Epub 2008 Jul 23]

A new isolate of hepatitis B virus from the Philippines possibly representing a new subgenotype C6. Cavinta L, Sun J, **May A**, Yin J, von Meltzer M, Radtke M, Barzaga NG, Cao G, Schaefer S. J Med Virol. 2009 Jun;81(6):983-7

Konferenzbeiträge Poster

May A, Sun J and Schaefer S. Interaction between the hepatitis B virus X protein and human damage-specific DNA binding protein. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Heidelberg, Germany 2005

Cavinta L, Sun J, **May A**, Radtke M, Barzaga NG and Schaefer S. New hepatitis B virus subgenotype from the Philippines. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Vancouver, Canada 2006

May A, Koch S and Schaefer S. Different replication rates of hepatitis B virus-genotypes. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Virus. San Diego, CA, USA 2008

Knoll S, Baselga SV, **May A**, Pützer BM and Schaefer S. Hepatitis B Virus X Protein-Mediated Apoptosis is Dependent on HBx-Induced Phosphorylation of p53 at Ser15 that Leads to p53 Nuclear Translocation. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Tours, France 2009

GenBank-NCBI-Eintragungen

EU410079, EU410080, EU410081, EU410082, EU670260, EU670261, EU670262, EU670263, EU670264, EU670265, GU385774

Eidesstattliche Erklärungen

Ich beantrage hiermit unwiderruflich, gem. §12 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock, die mündliche Prüfung in Form eines öffentlichen wissenschaftlichen Kolloquiums abzulegen.

Rostock, 29.07.2010

Anja May

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 29.07.2010

Anja May

Hiermit erkläre ich, gem. § 4 Abs. 1 (k) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Rostock, 29.07.2010

Anja May
